

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI OUZOU

FACULTE DES SCIENCES AGRONOMIQUES ET BIOLOGIQUES

THESE

Présentée par

Amar RIBA

En vue de l'obtention du titre de:

DOCTEUR D'ETAT ES SCIENCES BIOLOGIQUES

Option: **Microbiologie**

**RECHERCHE SUR LES CHAMPIGNONS PRODUCTEURS
D'AFLATOXINES ET D'OCHRATOXINE A DANS LA FILIERE BLE
EN ALGERIE**

Soutenue publiquement le 13/12/ 2008

Devant le jury composé de

M. Abderrahmane MATI	Professeur à l'U.M.M.T.O.	Président
M. Nasserline SABAOU	Professeur à l'E.N.S de Kouba, Alger.	Rapporteur
M. Zouaoui BOUZNAD	Professeur à l'I.N.A, Alger.	Examineur
Mme Meriem LOUANCHI	Maître de conférences à l'INA, Alger.	Examineur
Mme Farida MATI	Maître de conférences à l'U.M.M.T.O.	Examineur
M. Ahmed LEBRIHI	Professeur à l' INP-E.N.S.A.Toulouse.	Membre invité

DEDICACES

AVANT-PROPOS

Cette thèse de Doctorat n'aurait pu voir le jour sans le Professeur Nasserine Sabaou. Ses qualités, sa rigueur et sa patience, malgré ses nombreuses tâches, m'ont donné un second souffle pour poursuivre les travaux de la thèse. Il a été un directeur de thèse attentif, positif, encourageant et confiant. Aujourd'hui, je voudrais lui exprimer toute ma reconnaissance et le remercier d'avoir été très patient, très gentil tout au long de ces années.

Une grande partie de ce travail a été réalisée au Laboratoire de Génie Chimique UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS), Département « Bioprocédés & Systèmes Microbiens », ENSAT/INPT. France. J'adresse mes sincères remerciements à M. le Professeur Ahmed Lebrihi de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de veiller à ce que rien n'entrave le déroulement de mes manipulations.

Je remercie vivement les membres du jury, le Professeur A. Mati pour avoir accepté de présider le Jury, le Professeur Z. Bouznad, Mme M. Louanchi et Mme F. Mati pour avoir si gentiment accepté la lourde tâche d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier mes collègues et amis Dahmous Hamid et Baouane Kaci, techniciens de laboratoire de microbiologie (UMMTO), pour leur aide précieuse, leur disponibilité et leur gentillesse.

Je tiens à présenter ici toute ma gratitude ainsi que mon amitié aux personnes du laboratoire de l'ENS de Kouba et du laboratoire de Génie Chimique de ENSAToulouse, et tout particulièrement à N. Bouras, B. Badji, A. Zitouni, A. Atoui et tous les autres membres du laboratoire.

Je remercie l'Université M'hamed Bougara de Boumerdès de m'avoir permis d'effectuer la formation à distance pour finaliser ce travail.

Je ne saurais oublier tous ceux qui m'ont apporté leurs savoirs faire, leurs aides et leurs expériences nécessaires pour la réalisation de ce travail.

II. Les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A

1. Classification des champignons.....	27
2. Isolement et dénombrement des champignons toxigènes.....	27
3. Identification des champignons toxigènes.....	28
3.1. caractères morphologiques	28
3.2. caractères chimiques	31
3.3. caractères moléculaires	31
4. Genre <i>Aspergillus</i>	32
4.1. Définition.....	32
4.2. Les caractères morphologiques d'identification du genre <i>Aspergillus</i>	33
4.3. Approche polyphasique de classification des <i>Aspergillus</i>	33
4.4. Description morphologique du genre <i>Aspergillus</i>	34
4.5. Systématique des espèces d' <i>Aspergillus</i>	34
5. <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	36
5.1. Description morphologique de la section <i>Flavi</i>	36
5.2. Les espèces de la section <i>Flavi</i> et leurs mycotoxines	36
6. <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	41
6.1. Description morphologique de l'espèce <i>A. ochraceus</i>	41
6.2. Les espèces de la section <i>Circumdati</i>	41
7. <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	43
7.1. Description morphologique de la section <i>Nigri</i>	43
7.2. Les espèces de la section <i>Nigri</i> et leurs pouvoir producteur d'ochratoxine A	46

III. Les aflatoxines

1. Origine et propriétés physico-chimiques.....	47
2. Contamination en aflatoxines des denrées alimentaires.....	49
3. Facteurs influençant la teneur en aflatoxines dans les denrées.....	49
4. Toxicité.....	50
5. Mécanismes d'action et métabolisme.....	51

IV. L' ochratoxine A

1. Origine et propriétés physico-chimiques.....	51
2. Contamination des denrées alimentaires en OTA.....	53
3. Méthodes d'analyse l' ochratoxine A.....	56
3.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM).....	56

des fragments de restriction (PCR-RFLP).....	73
Séquençage de la région ITS1-5.8S-ITS2 amplifiées.....	73
3. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines et d'ochratoxine A	74
3.1. Détection de la fluorescence sur milieu de culture.....	74
3.2. Extraction d'aflatoxines du milieu de culture.....	74
3.3. Détection et confirmation de la production d'aflatoxines par CCM.....	75
3.4. Confirmation et quantification des aflatoxines par HPLC	75
4. Production et détection d'acide cyclopiazonique (CPA).....	77
4.1. Production d'acide cyclopiazonique.....	77
4.2. Détection d'acide cyclopiazonique.....	77
5. Etude du pouvoir producteur d'ochratoxine A.....	77
5.1. Culture et extraction.....	77
5.2. Détection et quantification.....	78
6. Extraction des aflatoxines et de l'ochratoxine A à partir des échantillons de blé	78
Principe général.....	78
Extraction à partir du blé.....	78
6.1. Purification de l'extrait.....	80
6.2. Préparation des solutions standards.....	80
6.3. Détermination du taux de rendement d'extraction de l'OTA.....	80
6.4. Confirmation de la présence des aflatoxines et de l'OTA.....	81
7. Analyse des aflatoxines dans les extraits de blé et dérivés par HPLC	81
8. Analyse de l'ochratoxine A dans les échantillons de blé et dérivés par HPLC.....	81
9. Etude de l'influence de la température et de l'activité de l'eau sur la croissance et la production d'aflatoxine B1 d'une souche d' <i>A. flavus</i>	81
9.1 Souche et milieux de culture utilisés	81
9.2 Inoculation et incubation	82
9.3 Détermination de la vitesse de croissance	82
9.4 Détermination du pouvoir de production d'AFB1.....	83

Partie III

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Analyse de la flore fongique des échantillons de blé et des produits dérivés

1. Reconnaissance des genres et des espèces.....	84
1.1. Reconnaissance des genres	
1.2. Reconnaissance des espèces du genre <i>Aspergillus</i>	85
1.3. Reconnaissance de l'espèce de <i>Penicillium verrucosum</i>	88
2. Distribution des genres fongiques dans les échantillons analysés.....	88

2.1. Résultats généraux	88
2.2. Distribution dans les échantillons de blé non stocké (pré-récoltes).....	92
2.3. Distribution dans les échantillons de blé stockés dans les silos.....	96
2.4. Distribution dans les échantillons de blé et dérivés	96
3. Distribution des espèces d' <i>Aspergillus</i> dans les échantillons analysés.....	97
II. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines par	
les isolats d'<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>.....	102
III. Caractérisation des <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> en fonction de la production d'aflatoxines,	
d'acide cyclopiazonique et de sclérotés.....	107
IV. Identification moléculaire des isolats d'<i>Aspergillus</i>	
section <i>Flavi</i>.....	110
1. Choix des souches.....	110
2. Analyse par RFLP.....	110
3. Séquençage et Phylogénie.....	110
V. Etude du pouvoir producteur d'ochratoxine A par les isolats d'<i>Aspergillus</i>	
et de <i>Penicillium</i> sp.....	114
VI. Contamination des échantillons de blé et dérivés par	
les aflatoxines et l'OTA	120
1. Contamination des échantillons de blé et dérivés par les aflatoxines.....	120
2. Contamination des échantillons de blé et dérivés par l'OTA.....	129
VII. Influence de la température, de l'activité de l'eau et du milieu de	
culture sur la croissance et la production de l'aflatoxine B1 par	
la souche AF 92 d'<i>A. flavus</i>	
1. Influence sur la croissance de la souche AF92 d' <i>A. flavus</i>	131
2. Influence sur la production d'AFB1 par la souche AF92 d' <i>A. flavus</i>	131
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....	138
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	145
ANNEXES	

Abstract

The aim of this work is to analyze fungal flora of wheat, aflatoxins-producing and ochratoxin A (OTA)-producing mould and contaminated wheat by these mycotoxins. Dilution plating was used as enumeration technique. The principal genera and species potentially toxigenic were identified by the study of the morphological features and sometimes by molecular techniques. To evaluate the aflatoxins-producing and OTA-producing potential by *Aspergillus* strains, the chromatographic methods were used.

A total of 108 samples of wheat were collected during preharvest, storage in silos, and after processing was analyzed. The mean value counts of fungi ranged from 144 to 1277 CFU g⁻¹. A great heterogeneity was observed in the distribution of the fungal flora. The most fungal genera isolated were *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* and *Mucor*. The dominant genus was *Aspergillus*, predominantly *A. flavus*, *A. niger* and *A. versicolor*. The other isolated species were *A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. carbonarius*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. candidus* and *Aspergillus* spp. The occurrence and the levels of the typically ochratoxigenic species, *A. ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. alliaceus* were relatively lower than other *Aspergillus* species.

The study of the ability to produce aflatoxins shows that the percentages of aflatoxigenic isolates detected on Coconut Agar Medium and by TLC and HPLC were 30%, 31% and 72% respectively. Amounts of aflatoxin B1 (AFB1) produced ranged from 0.02 to 234.6 µg g⁻¹.

The study of the morphological and chemotypic features of the *Aspergillus* section *Flavi* isolates indicates that this section is dominated by *A. flavus* species. The molecular analysis confirmed the aflatoxigenic isolated from the wheat samples and wheat products have the same origin and *A. flavus* species is the principal source of aflatoxins.

The most species involved in the production of OTA in Algerian wheat were *Aspergillus ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. carbonarius*, and also *A. Niger*, *A. terreus*, *A. fumigatus* *A. versicolor* and *Penicillium verrucosum*.

In this study, the levels of AFB1 and OTA were determined by HPLC in 53 ground samples. The results show an incidence of 56.6 and 35.8% of contamination wheat by AFB1 and OTA respectively. These mycotoxins were detected both in wheat grain from field, storage and wheat products (flour and semolina). Our findings demonstrate that these mycotoxins can contaminate wheat in the field, storage and the wheat products.

This study is a contribution to the analysis of the contamination risks of wheat by aflatoxins and ochratoxin A. Recommendations for further research and as preventives measures were proposed.

Key words: mould, mycotoxins, aflatoxins, ochratoxin A, wheat

Résumé

L'objectif de ces travaux est d'analyser la flore fongique de la filière blé, d'étudier dans les conditions *in vitro* le potentiel de production d'aflatoxines et d'ochratoxine A (OTA) des isolats potentiellement toxigènes et d'évaluer les niveaux de contamination du blé et de ses dérivés par ces deux mycotoxines.

La démarche générale qui a été adoptée consiste en l'isolement et le dénombrement des moisissures contaminant la filière blé, en utilisant la technique des suspensions-dilutions et ensemencement sur milieu gélosé. Les principaux genres et espèces potentiellement toxigènes sont ensuite identifiés par l'étude des caractères morphologiques et parfois par des techniques moléculaires. La capacité de production *in vitro* des aflatoxines et de l'OTA des isolats appartenant au genre *Aspergillus* a été déterminée par analyses chromatographiques. Afin d'évaluer les risques liés à la présence de ces mycotoxines dans la filière, nous avons effectué, après une extraction par partition, leur dosage par HPLC dans les échantillons représentant les différents maillons de la filière.

Les résultats de l'analyse fongique de 108 échantillons de blé et dérivés collectés à différentes phases (blé des champs, blé stocké dans les silos, semoule, farine et son) ont montré que le nombre de propagules fongique varie entre 144 et 1277 cfu/g. Une grande hétérogénéité est observée dans la densité de la flore fongique au sein des échantillons de même origine et de même catégorie. Les principaux genres fongiques isolés sont *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Mucor*. Le genre *Aspergillus* est celui qui domine dans la majorité des échantillons analysés. Parmi les espèces d'*Aspergillus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor* et à un degré moindre, *A. terreus*, sont les plus dominantes. Les espèces typiquement ochratoxinogènes, *A. ochraceus*, *A. carbonarius* et *A. alliaceus*, sont faiblement représentées dans les échantillons analysés.

L'étude du pouvoir producteur d'aflatoxines a révélé un taux d'isolats aflatoxinogènes de 30%, 31% et de 72% sur milieu à base de noix de coco, par CCM et par HPLC respectivement. Les quantités d'aflatoxine B1 (AFB1) produites sont comprises entre 0,02 et 234,6 µg/g. L'ensemble des résultats relatifs à l'étude des caractères morphologiques et chimiotypiques des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* indique que cette section est dominée par l'espèce *A. flavus*. Les résultats de l'analyse moléculaire ont confirmé l'hypothèse selon laquelle les isolats aflatoxinogènes isolés des échantillons de blé et dérivés ont une même origine et que l'espèce *A. flavus* est la principale source d'aflatoxines.

Les espèces impliquées dans la production d'OTA dans le blé algérien sont surtout *Aspergillus ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. carbonarius*, et à un degré moindre *A. niger*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. versicolor* et *Penicillium verrucosum*.

L'analyse par HPLC de l'AFB1 et de l'OTA a montré un taux de contamination de 56,6 et 35,8% respectivement. Les deux mycotoxines ont été détectés à différents maillons de la chaîne. Ces observations confortent l'idée selon laquelle la contamination peut avoir lieu au champ, au cours du stockage et après transformation des graines de blé.

Ce travail est une contribution à une analyse des risques liés à la contamination du blé par les aflatoxines et l'ochratoxine A en Algérie. Il ouvre la porte à de nombreux autres travaux sur la contamination des denrées alimentaires de large consommation aux aflatoxines et à l'OTA. Au plan préventif, il convient d'émettre un certain nombre de recommandations pour réduire les risques liés à la présence de ces mycotoxines dans l'alimentation.

Mots clés: champignons, mycotoxines, aflatoxines, ochratoxine A, blé

INDEX DES TABLEAUX ET DES FIGURES

Tableau 1. Principales mycotoxines et moisissures productrices retrouvées en alimentation humaine et/ou animale	6
Tableau 2. Origine chimique des mycotoxines.....	6
Tableau 3. Contamination en moisissures et en mycotoxines de diverses denrées alimentaires	8
Figure 1. Facteurs environnementaux influençant la production des mycotoxines.....	10
Tableau 4. Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement.....	14
Tableau 5. Teneurs maximales en aflatoxines exprimées en µg/kg dans l'Union Européenne	17
Tableau 6. Valeurs médianes et intervalles de variation des niveaux maximaux tolérés en 1995 et 2003 (µg/kg) des aflatoxines et nombre de pays disposant de réglementations	19
Tableau 7. Limites réglementaires algériennes des aflatoxines dans les produits d'alimentations humaine et animale (données de 2003).....	19
Tableau 8. Teneurs maximales en ochratoxine A dans les denrées alimentaires exprimées en µg/kg	20
Figure 2. Concentrations maximales pour l'ochratoxine A dans les céréales et les produits céréaliers, à l'échelle mondiale	20
Figure 3. Structure du grain de blé	25
Tableau 9. Composition du blé en divers éléments, exprimée en % de la matière sèche.....	25
Figure 4. Structures micromorphologiques des moisissures rencontrées couramment dans les produits alimentaires.....	29
Figure 5. Représentation d'une unité d'ADN ribosomal.	32
Figure 6. Caractères micromorphologiques du genre <i>Aspergillus</i>	34
Figure 7. Aspects macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus flavus</i>	37
Tableau 10. Espèces d' <i>Aspergillus</i> de la section <i>Flavi</i> et leurs métabolites	38
Tableau 11. Production d'aflatoxines B et G, d'acide cyclopiazonique et d'acide kojique par les principales espèces d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	40
Figure 8. Structure chimique de l'acide cyclopiazonique (CPA).....	40
Figure 9. Aspects macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus ochraceus</i>	42
Tableau 12. Espèces d' <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i> et leurs métabolites	44
Figure 10. Aspects macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	45
Figure 11. Structures chimiques des aflatoxines B1, B2, G1, G2, M1 et M2.....	48
Tableau 13. Propriétés physico-chimiques des principales aflatoxines	48
Figure 12. Voies de biotransformation de l'aflatoxine B1.....	52
Figure 13. Structure chimique générale des ochratoxines (a), l'ochratoxine A (b), l'ochratoxine α (c) et l'ochratoxine β (d)	54
Tableau 14. Données concernant la fréquence et le taux de contamination en OTA de divers aliments.....	55
Figure 14. Localisation géographique des régions de prélèvements des échantillons de blé	61
Tableau 15. Caractéristiques des échantillons de blé et dérivés collectés en 2004 à différentes phases (pré-récolte, stockage et transformation).....	63

Figure 15. Plan d'échantillonnage montrant les points de prélèvement des échantillons de blés collectés dans une parcelle d'un hectare.....	64
Figure 16. Diagramme de transformation de blé dans une meunerie ou semoulerie montrant le positionnement des 4 niveaux de prélèvement des échantillons.	66
Tableau 16. Caractéristiques des échantillons de blé de la récolte 2006 collectés au niveau des CCLS de Blida, Tizi Ouzou et Sétif et de l'ITGC de Sétif.....	68
Figure 17. Schéma des connexions de la KOBRA Cell à l'HPLC.....	76
Figure 18. Protocole d'extraction des aflatoxines et de l'OTA d'un échantillon de blé.	79
Figure 19. Aspects macroscopique et microscopique du genre <i>Fusarium</i>	86
Figure 20. Aspects macroscopique et microscopique du genre <i>Alternaria</i>	87
Figure 21. Aspects macroscopique et microscopique du genre <i>Mucor</i>	87
Figure 23. Isolat de <i>Penicillium verrucosum</i> producteur d'ochratoxine A.....	90
Tableau 17. Distribution des principaux genres fongiques isolés des échantillons de blé stockés et non stockés de la récolte 2004.....	91
Tableau 18. Distribution des principaux genres fongiques isolés des échantillons de blé tendre et de blé dur et de leurs dérivés, collectés en 2005 au niveau de la meunerie de Tademaït (Tizi Ouzou) et de la semoulerie de Baghlia (Boumerdès).	93
Tableau 19. Flore fongique totale et fréquence des genres <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> et <i>Fusarium</i> et des principales espèces du genre <i>Aspergillus</i> dans les échantillons de blé de la récolte 2006..	94
Figure 24. Fréquence moyenne des principaux genres fongiques isolés des 85 échantillons de blé et dérivés de la récolte de 2004.....	95
Figure 25: Fréquence moyenne des genres <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> et <i>Fusarium</i> et des principales espèces potentiellement toxigènes dans les échantillons de blé de la récolte de 2006.....	95
Tableau 20. Distribution des espèces d' <i>Aspergillus</i> isolées des échantillons de blé stockés et non stockés de la récolte de 2004.....	98
Tableau 21. Distribution des espèces d' <i>Aspergillus</i> isolées des échantillons de blé et dérivés récoltés dans la meunerie de Tademaït et de la semoulerie de Baghlia.....	99
Figure é 26. Fréquence des principales espèces du genre <i>Aspergillus</i> isolées des échantillons de blé et dérivés de la récoltes 2004.....	100
Figure 27. Fréquence des isolats aflatoxinogènes d' <i>Aspergillus flavus</i> déterminée par visualisation de la fluorescence sur milieu CAM, sur CCM et par HPLC.....	103
Figure 28. Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V. (365 nm) de la production des aflatoxines par <i>Aspergillus flavus</i> sur milieu à base d'extrait de noix coco.	103
Figure 29. Chromatogrammes des extraits méthanoliques de trois isolats d' <i>Aspergillus flavus</i> producteurs d'aflatoxine B1 (AFB1) et d'aflatoxine B2 (AFB2).	104
Tableau 22. Répartition des 150 isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> en fonction des quantités d'AFB1 produites sur milieu CAM incubé pendant 5 jours à 28°C.	105
Figure 30. Répartition des isolats aflatoxinogènes (en %) en fonction des quantités d'AFB1 produites (µg/g de milieu) sur milieu CAM à base d'extrait de noix de coco.....	105
Tableau 23. Répartition des isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> en différents groupes	

(morpho-chimiotypes) selon la production, d'AFB1, de CPA et de sclérotés.....	108
Figure 31. Profil électrophorétique des fragments de restriction générés par l'enzyme BglIII de la portion IGS amplifiée à partir des amorces IGS-F et IGS-R.....	111
Figure 32. Profil électrophorétique des produits PCR obtenus par amplification de la région ITS1-5.8S-ITS2 de l'ADNr à partir des amorces ITS1 et ITS2 des isoaltes d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	111
Figure 33. Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences de la région ITS1-5.8S-ITS2 de l'ADNr et montrant les relations entre nos souches isolées des échantillons de blé et des souches-types des espèces d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> productrices d'aflatoxines.....	113
Tableau 24. Nombre et pourcentage d'isolats d' <i>Aspergillus</i> et de <i>Penicillium</i> ochratoxinogènes isolés des échantillons de 2004.....	115
Tableau 25. Distribution des isolats producteurs d'OTA dans les échantillons de blé et dérivés collectés en 2004 à différents stades (pré-récolte, stockage et produits finis).....	116
Tableau 26. Espèces fongiques ochratoxinogènes et teneurs en OTA dans les échantillons de blé de la récolte 2006 collectés dans les régions de la Mitidja et de Sétif.	117
Tableau 27. Nombre et pourcentage d'isolats d' <i>Aspergillus</i> et de <i>Penicillium</i> ochratoxinogènes isolés des échantillons de blé de la récolte 2006 dans les régions de la Mitidja et de Sétif.....	118
Tableau 28. Résultat global du taux de contamination par l'AFB1 et l'OTA des 53 échantillons de blé et dérivés collectés en 2004 et en 2006	121
Figure 34. Résultat global du taux de contamination par l'AFB1 et l'OTA des échantillons de blé de la récolte 2004 et 2006.....	121
Figure 35. Chromatogramme d'un échantillon de blé contaminé par l'AFB1.	
Figure 36. Chromatogramme d'un échantillon de farine contaminé par l'OTA.....	122
Tableau 29. Détection de l'aflatoxine B1 et de l'OTA dans les échantillons de blé de la récolte 2004 collectés au champ et stockés dans le silo.....	124
Tableau 30. Détection de l'aflatoxine B1 et de l'OTA dans les échantillons de blé collectés au niveau de la meunerie et de la semoulerie dans la région de Tizi Ouzou.....	124
Tableau 31. Résultat global du niveau de contamination par l'aflatoxine B1 et l'OTA des échantillons de blé de la récolte 2006	125
Figure 37. Taux de contamination global par l'AFB1 et l'OTA des échantillons de blé de la récolte 2006 prélevés dans les régions de la Mitidja et de Sétif.....	125
Tableau 32. Détection de l'aflatoxine B1 et de l'OTA dans les échantillons de blé de la récolte de 2006 collectés dans les régions de la Mitidja et de Sétif.....	126
Tableau 33. Exemples des niveaux de contamination de quelques céréales par les aflatoxines rapportés dans la bibliographie.....	127
Tableau 34. Influence de l'activité de l'eau (a_w) et de la température sur la vitesse de croissance radiale (mm/jour) de la souche AF92 d' <i>A. flavus</i> sur milieux CYA et extrait de blé.....	133
Figure 38. Influence de l'activité de l'eau (a_w) et de la température sur la vitesse de croissance radiale (mm/jour) de la souche AF92 d' <i>A. flavus</i> sur milieux CYA et extrait de blé.....	134

Figure 39. Influence de l'activité de l'eau (a_w) et de la température sur la production de l'AFB1 par la souche AF92 d' <i>A. flavus</i> sur milieux CYA et extrait de blé après 21 jours d'incubation.....	134
Tableau 35. Influence de l'activité de l'eau (a_w) et de la température sur la production de l'AFB1 ($\mu\text{g/g}$ de milieu) de la souche AF92 d' <i>A. flavus</i> sur milieux CYA et extrait de blé...	135
Figure 40. Influence de l'activité de l'eau et de la température sur la production de l'AFB1 par la souche AF92 d' <i>A. flavus</i> incubée à 28°C pendant 21 jours sur milieu CYA.....	136
Figure 41. Influence de l'activité de l'eau et de la température sur la production de l'AFB1 par la souche AF92 d' <i>A. flavus</i> , incubée à 28°C sur milieu extrait de blé.....	136

Liste des abréviations

AFB1: aflatoxine B1.

ADN: Acide désoxyribonucléique.

AFSSA: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

AIEA: Agence Internationale des Energies Atomiques.

AOAC: Association of Official Analytical Chemists.

ARN: Acide ribonucléique.

a_w : Activité de l'eau.

CAM : Coconut Agar Medium.

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands.

CCLS: Coopérative des Céréales et de légumes Secs.

CE: Commission Européenne.

CFU: Colonie Formant Unité.

CPA : acide cyclopiazonique.

CYA: Czapeck Yeast Extract Agar.

DRBC: Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar.

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

Em.: Emission.

Ex.: Excitation.

FAO: Food and Agriculture Organization.

HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point (Système de contrôle et d'analyse des risques des points critiques pour leur maîtrise).

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IAC: Immuno Affinity Column.

IARC: International Agency for research on cancer.

IGS: Intergenic Spacer.

ITS: Internal Transcribed Sequence.

JEFCA: Joint Expert Committee of Food Additives.

MEA: Malt Extract Agar.

NRRL : Northern Regional Research Laboratory.

ng: nanogramme (10^{-9} g)

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

OTA: Ochratoxine A.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism.

SCOOP: Scientific Cooperation (UE).

UV: Ultra-Violet.

μ g : microgramme (10^{-6} g).

Listes des publications et communications

I- Publications

1- Publication en rapport avec la thèse de doctorat d'Etat

RIBA A., MOKRANE S., MATHIEU F., LEBRIHI A., SABAOU N. (2008). Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *International Journal of Food Microbiology* **122**, 85–92.

2- Publications en dehors de la thèse de doctorat

- BADJI. B, **RIBA A.** MATHIEU F. LEBRIHI A. SABAOU N. (2005). Activité antifongique d'une souche d'*Actinomyces* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de Mycologie Médicale*, **15**, 211-219.
- AMIR H. **RIBA A.** AMIR A. BOUNAGA N. (1989). Influence de la salinité des sols de palmeraies sur les *Fusarium*. I- Relation entre la conductivité des sols et la densité des *Fusarium*. *Rev. Ecol. Biol.Sols*, **26** (4): 391-406
- AMIR H. **RIBA A.** (1990). Influence de la salinité des sols de palmeraies sur les *Fusarium*. II: Action des sels de sebkha sur l'expression de la fusariose. *Rev. Biol.Ecol.Sols*, 1990: 22: 313-330.
- AMIR H., AMIR A. et **RIBA A.** (1996). Rôle de la microflore dans la résistance à la fusariose induite par la salinité dans un sol de palmeraie. *Soil.Biol.Biochem.* vol. **28** (1): 113-122.

II – Communications

- **RIBA A.**, MOKRANE S. , BADJI B., LEBRIHI A. et SABAOU N.(2008). Contamination de la filière blé par les populations d'*Aspergillus* productrices d'aflatoxines. *Premières Journées Algéro-Tunisiennes de Microbiologie*. 18-19 Mai 2008. Département de Biologie, Centre Universitaire de Tébessa.
- **RIBA A.**, SABAOU N., MATHIEU F.et LEBRIHI A. (2005). Premières investigations sur les champignons producteurs d'ochratoxine A dans la filière céréale en Algérie. *Symposium Euromaghrébin sur les contaminations biologiques, chimiques et la sécurité alimentaire*. 7-8 Septembre 2005. Fès, Maroc.
- BADJI B., **RIBA A.**, MATHIEU F., LEBRIHI A. et SABAOU N. (2005). Activité antagoniste d'un actinomycète rare d'origine saharienne contre certains champignons pathogènes et toxigènes. *IIèmes journées de Biologie*. 15 et 16 novembre 2005.Université de Boumerdès.
- **RIBA A.**, AMIR H. et AMIR A. (1999). Influence de quelques facteurs biotiques et abiotiques sur le niveau de réceptivité des sols aux fusarioses. *Séminaire sur l'agriculture et l'hydraulique dans les régions arides et semi-arides*. Ouargla, du 15-17 novembre 1999.

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies d'origine alimentaire constituent l'un des problèmes les plus préoccupants à l'échelle mondiale. Ces maladies engendrent à la fois des souffrances humaines et de graves retombées économiques et sociales. Parmi les contaminants biologiques, la contamination des produits alimentaires par les mycotoxines a récemment été reconnue par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S) comme source importante de maladies d'origine alimentaire (O.M.S, 2002). L'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (F.A.O) estime qu'environ un quart des récoltes de la planète est significativement contaminé par les mycotoxines, occasionnant des pertes mondiales estimées de 5 à 10 % (Yiannikouris et Jouany, 2002).

Les mycotoxines sont produites par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Les principales mycotoxines présentant une importance sur le plan sanitaire et agroéconomique sont les aflatoxines, les ochratoxines, les fumonisines, certaines trichothécènes, la zéaralénone et la patuline (Hussein et Brasel, 2001; Creppy, 2002; Jarvis et Miller, 2005). Ces substances peuvent occasionner des effets cancérogènes, mutagènes, tératogènes, immunosuppresseurs, allergiques, oestrogéniques, nécrosants, neurotoxiques et néphrotoxiques (Bennett et Klich, 2003). De très nombreuses données épidémiologiques ont montré des associations fréquentes entre la consommation de certains aliments et l'incidence de certains cancers, comme par exemple, l'insuffisance hépatique et le cancer du foie liés à l'aflatoxine B1 (Pfohl-Leszkowicz et Castegnaro, 1999). L'incrimination de l'ochratoxine A dans les cancers des voies urinaires est également suspectée (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002).

Les céréales et leurs produits dérivés présentent le plus grand facteur de risque en raison de leur fréquence de contamination par les mycotoxines et de leur consommation importante. La contamination d'un produit d'origine végétale par les mycotoxines peut se faire tout au long de la filière: production, stockage, transport, transformation et conditionnement (Doré *et al.*, 2002). La production d'une mycotoxine dépend à la fois du potentiel génétique de la souche et de son environnement.

Etant donné la grande stabilité des mycotoxines aux différents traitements disponibles, l'application de bonnes pratiques agricoles et d'hygiène au stade de la production, de la transformation et de la distribution des denrées alimentaires, restent la seule alternative permettant de réduire les risques liés à la contamination par les mycotoxines.

Afin d'établir les mesures s'appuyant sur la prévention, il est important de réaliser un travail de recherche fondamental pour chaque mycotoxine. Celui-ci consiste à rechercher et à identifier les espèces toxigènes présentes dans les matières destinées à l'alimentation et à étudier leur comportement vis à vis des différents facteurs environnementaux.

Le premier objectif de cette thèse est d'analyser la flore fongique de la filière blé, d'étudier dans les conditions *in vitro* le potentiel de production d'aflatoxines et d'ochratoxine A des isolats potentiellement toxigènes et d'évaluer les niveaux de contamination du blé et de ses dérivés par ces deux mycotoxines. Le choix s'est porté sur ces mycotoxines en raison de leurs toxicités élevées et de la possibilité de leur accumulation dans le blé. En effet, les *Aspergillus*, souvent retrouvés dans les régions à climat chaud, sont à l'origine de la contamination d'un grand nombre de produits d'origine végétale, notamment les céréales, par les aflatoxines et l'ochratoxine A. Par exemple, le blé contribue à environ 50% à l'exposition de l'homme à l'ochratoxine A (Canadas, 2006).

En Algérie, la céréaliculture représentée essentiellement par le blé, occupe plus de 60% de la surface de production agricole du pays. Néanmoins, le pays doit importer d'énormes quantités de blé pour satisfaire à la demande nationale. De très nombreuses publications ont été consacrées à la contamination des céréales par les aflatoxines et l'ochratoxine A (OTA) de par le monde. En Algérie, aucun travail n'a, à notre connaissance, été publié jusqu'à présent sur la contamination des céréales et d'autres denrées par les moisissures toxigènes et leurs mycotoxines.

Cette première étude sur les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A en Algérie sera présentée de cette manière:

Dans la partie théorique (revue bibliographique), nous évoquerons tout d'abord les généralités sur les moisissures et les mycotoxines, la biogenèse des mycotoxines, leurs effets sur la santé, les méthodes générales de leur détection, la réglementation et les stratégies de lutte et de prévention. Nous présenterons ensuite les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A du point de vue taxonomique et écologique. Une revue bibliographique sur les aflatoxines et l'OTA sera également donnée.

Dans la partie expérimentale, la démarche générale qui a été adoptée consiste en l'isolement et le dénombrement des moisissures contaminant la filière blé, en utilisant la technique des suspensions-dilutions et ensemencement sur milieu gélosé. Les principaux genres et espèces

potentiellement toxigènes sont ensuite identifiés par l'étude des caractères morphologiques et parfois par des techniques moléculaires. La capacité de production *in vitro* des aflatoxines et de l'OTA des isolats appartenant au genre *Aspergillus* a été déterminée par analyses chromatographiques. Afin d'évaluer les risques liés à la présence de ces mycotoxines dans la filière, nous avons effectué, après une extraction par partition, leur dosage par HPLC dans les échantillons représentant les différents maillons de la filière. Enfin, une étude de l'influence de l'activité de l'eau et de la température sur la production *in vitro* des aflatoxines par une souche d'*A. flavus* a également été réalisée.

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités

1. Généralités sur les moisissures et les mycotoxines

Le terme de «moisissure» n'a pas réellement de signification systématique; il est communément utilisé pour désigner des champignons microscopiques filamenteux (Guarro *et al.*, 1999). Les moisissures sont constituées par des filaments ramifiés, les hyphes, dont l'ensemble est connu sous le nom de mycélium. Ils sont classés dans le règne des champignons. Au sein de ce règne, renfermant suivant les auteurs de 65 000 à 100 000 espèces différentes, les moisissures constituent un ensemble hétérogène d'environ 20 000 espèces. Ces microorganismes eucaryotes appartiennent en majorité à 3 classes: les Zygomycètes, les Deutéromycètes et les Ascomycètes.

Les moisissures sont douées d'une grande capacité d'assimilation des substrats organiques grâce à leur potentiel élevé de sécrétion d'enzymes extracellulaires leur permettant de s'attaquer à une gamme très large de composés naturels, tels que la cellulose, la chitine ou la lignine (Florent, 1993).

Ces organismes microscopiques produisent une grande variété de métabolites secondaires. Certains d'entre eux sont très utiles à l'Homme et présentent un intérêt considérable dans les différents domaines (agriculture, biotechnologie, environnement, santé, etc.). Ainsi, dans les milieux naturels, les moisissures contribuent, avec d'autres microorganismes, à la biodégradation et au recyclage des matières organiques, comme la litière ou le bois. D'autres sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire pour la transformation et la production de divers produits utiles tels que les enzymes (protéases et pectinases) et les acides organiques (acide citrique et gluconique) ou encore dans l'affinage des fromages. Dans le domaine pharmaceutique, les moisissures sont utilisées surtout pour la production d'antibiotiques (pénicilline, céphalosporine, etc.) (Botton, 1990). Environ 22% des antibiotiques identifiés et 40% des enzymes produites industriellement sont élaborés par les champignons filamenteux (Demain et Fang, 2000).

En revanche, le développement indésirable des moisissures sur une denrée peut entraîner de multiples nuisances: modification de l'aspect, altération des qualités organoleptiques et des propriétés technologiques, réduction quantitative et qualitative de la valeur alimentaire, et risque de mycose et d'allergie. Cependant, l'impact le plus négatif de l'altération des denrées alimentaires est sans doute celui lié à la synthèse de substances toxiques: les mycotoxines. La contamination des aliments par des substances toxiques produites par des champignons est un phénomène connu de longue date. En effet, dès le moyen-âge furent décrits les effets hallucinogènes produits par l'ingestion d'un parasite du seigle, l'ergot du seigle ou *Claviceps purpurea*. De nos jours, on sait

que le « Feu de Saint Antoine » est attribuable à certains alcaloïdes produits par l'ergot de seigle. Vers 1900, des chercheurs japonais relieront certaines manifestations cliniques à l'ingestion de riz moisi. En U.R.S.S., entre 1942 et 1947, de nombreuses personnes décédèrent (jusqu'à 10% dans certaines collectivités) suite à la consommation de blé et de millet contaminé par un micro-organisme du genre *Fusarium*. Cependant, le premier accident mycotoxicologique de la période moderne fut l'hécatombe de plusieurs élevages de dindes, au début des années 60, provoquée par la consommation de tourteaux d'arachides fortement contaminés par *Aspergillus flavus*. Les travaux entrepris sur la « maladie X du dindon » furent d'ailleurs à l'origine de la découverte des mycotoxines. Et cet évènement sera le point de départ de quatre décennies de recherches sur les mycotoxines.

Plus de 300 métabolites secondaires sont produits par les moisissures (Bhatnagar *et al.* 2002), mais le terme « mycotoxine » est réservé à ceux qui ont des propriétés toxiques préoccupantes pour la santé humaine et animale (Watson, 1984; Hsieh, 1992), contrairement aux phytotoxines qui sont toxiques pour les plantes. Il est à signaler que certaines toxines (ex. fumonisines et acide fusarique) sont toxiques aussi bien pour l'homme et les animaux que pour les plantes. Les mycotoxines sont produites par des moisissures appartenant notamment aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Tableau 1). Les principaux groupes présentant une importance agroéconomique et des effets délétères sur la santé humaine prouvés ou fortement suspectés sont les aflatoxines, les ochratoxines, les fumonisines, certaines trichothécènes, la zéaralénone et la patuline (Creppy, 2002; Hussein et Brasel 2001).

Les mycotoxines ont trois origines biosynthétiques principales: les polyacétates, les terpènes et les acides aminés. Selon la voie de leur biosynthèse, les mycotoxines présentent des origines chimiques très diverses (Tableau 2): il s'agit de composés dérivés des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, slaframmine, gliotoxine, roquefortine et sporodesmine), ou des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxines, patuline, citrinine, acide pénicillique, stérigmatocystine et zéaralénone) ou encore des terpènes (diacétoxyscirpénol, fusarénone, désoxynivalénol, roridines, toxine T-2 et verrucarine) (Turner, 1983).

2. Les moisissures et les mycotoxines dans la chaîne alimentaire

La formation de mycotoxines peut s'effectuer à tous les stades, depuis le champ jusqu'au produit commercialisé consommé par l'homme ou l'animal. Ces toxines se retrouvent à l'état de

Tableau 1. Principales mycotoxines et moisissures productrices retrouvées en alimentation humaine et/ou animale (Bennet et Klich, 2003).

Mycotoxines	Champignons	Denrées
Aflatoxines B1, B2, G1 et G2.	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. pseudotamarii</i> et <i>A. ochraceoroseus</i> .	Arachides, céréales, graines de coton, épices et fruits.
Ochratoxines A, B, C.	<i>Aspergillus ochraceus</i> et <i>Penicillium viridicatum</i> .	Légumes, céréales et graines de café.
Zéaralénone.	<i>Fusarium graminearum</i> et <i>F. sporotrichoides</i>	Maïs, blé, orge, etc.
Fumonisines.	<i>Fusarium moniliforme</i> .	Maïs et autres céréales.
Trichothécènes (Toxine T-2, DON, NIV).	<i>Fusarium</i> spp.	Maïs et blé.
Alcaloïde de l'ergot.	<i>Claviceps purpurea</i> et <i>C. paspali</i> .	Blé et dérivés et seigle.
Patuline.	<i>Aspergillus</i> spp. et <i>Penicillium</i> spp.	Fruits (pommes, prunes, pêches, poires, abricots).
Citrinine.	<i>P. rubrum</i> , <i>P. purpurogenum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. citrinum</i> et <i>A. ochraceus</i> .	Orge, blé, riz, soja et seigle.

DON: déoxynivalénol. NIV: nivalénol.

Tableau 2. Origine chimique des mycotoxines (Ueno et Ueno, 1978).

Mycotoxines dérivées des acides aminés	Mycotoxines dérivées des polycétoacides	Mycotoxines dérivées des terpènes
Alcaloïdes de l'ergot.	Aflatoxines.	Diacétoxyscirpénol (DAS).
Acide cyclopiazonique (CPA).	Acide pénicillique.	Déoxynivalénol.
Acide aspergillique.	Citrinine.	Fusarénone.
Fumitrémorgines.	Ochratoxines.	Roridines.
Gliotoxine.	Patuline.	Toxine T2.
Roquefortine.	Rubratoxines.	Verrucarines, etc.
Slaframine.	Stérigmatocystine.	
Sporodesmine, etc.	Zéaralénone, etc.	

contaminants naturels de nombreuses denrées d'origine végétale, notamment les céréales mais aussi les fruits (dont les noix, les amandes, les arachides etc.), les fourrages ainsi que les aliments composés et manufacturés issus de ces filières et destinés à l'alimentation humaine et animale (Tableau 3). La F.A.O (Food and Agriculture Organisation) estime qu'environ un quart des récoltes de la planète est significativement contaminé par les mycotoxines occasionnant des pertes mondiale estimées de 5 à 10 % (Yiannikouris et Jouany, 2002). Comme elles sont peu métabolisées par les organismes vivants, les mycotoxines peuvent également se transmettre *via* les produits d'origine animale (lait et produits laitiers, abats, charcuterie, etc.) (Pitt, 2000). Les mycotoxines possèdent des structures chimiques leur conférant une bonne stabilité et de ce fait, les procédés alimentaires usuels (cuisson, lyophilisation, congélation et irradiation) ne peuvent pas les détruire totalement (Scott, 1984; Park, 2002).

3. Biogénèse des mycotoxines

Le métabolisme secondaire, dont les mycotoxines sont issues, se distingue du métabolisme primaire par la grande diversité des composés formés et par la nature aléatoire de son activation et la spécificité des espèces et des souches impliquées. Du point de vue écologique, deux groupes de champignons toxigènes peuvent être distingués (Christensen *et al.*, 1977):

- Les champignons de « champs » qui contaminent les produits agricoles avant ou pendant la récolte, principalement *Fusarium* et *Alternaria*, mais aussi des *Aspergillus* dans le cas des régions à climat chaud.

- Les champignons de « stockage » (*Penicillium* et *Aspergillus*) qui tendent à contaminer les denrées alimentaires pendant leur stockage. Des champignons du sol ou des débris de plantes peuvent disséminer leurs spores sur la plante ou les grains puis proliférer pendant le stockage si les conditions sont favorables. Toutefois, certaines mycotoxines, formées principalement au cours de la conservation, peuvent apparaître parfois avant la récolte. C'est le cas des aflatoxines dans l'arachide, le maïs et le coton. Cet aspect sera détaillé dans le chapitre consacré à l'écologie des *Aspergillus* section *Flavi*.

Le profil et la quantité de mycotoxines produites est un phénomène complexe qui dépend non seulement des espèces fongiques et des souches qui les produisent (Lacey, 1986), mais aussi de l'interaction de nombreux facteurs incluant la composition du substrat, l'humidité, la température, l'aération et les interactions entre les autres microorganismes (C.A.S.T, 2003). Actuellement, il est impossible de dégager des lois générales de la toxigenèse.

Tableau 3. Contamination en moisissures et en mycotoxines de diverses denrées alimentaires (C.A.S.T, 1989).

Denrées	Espèces toxiques contaminantes	Mycotoxines contaminantes
Blé, farine, pain, maïs et chips.	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P.citreoviride</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P.martensii</i> , <i>P. patulum</i> , <i>P. pubertum</i> et <i>Fusarium moniliforme</i> .	Aflatoxines, ochratoxines, stérigmatocystine, acide pénicillique et patuline.
Arachides et noix.	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. expansum</i> et <i>P. cyclopium</i> .	Aflatoxines, ochratoxines, stérigmatocystine, trichothécènes, cytochalasines et patuline.
Pommes et produits dérivés.	<i>Penicillium expansum</i> .	Patuline.
Tourte à la viande, viande cuite, fromage, cacao et houblon.	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>P. roquefortii</i> , <i>P. patulum</i> et <i>P. commune</i> .	Aflatoxines, ochratoxines, stérigmatocystine, patuline et acide pénicillique.
Viandes, porc salé et fromage.	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> et <i>P. cyclopium</i> .	Aflatoxines, ochratoxines, stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique et pénitrème.
Fèves, orge, maïs, sorgho et soja.	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Alternaria</i> spp., <i>Fusarium moliniforme</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. islandicu</i> et <i>P. urticae</i> .	Aflatoxines, ochratoxines, stérigmatocystine, alternariol, griséofulvine, patuline, acide pénicillique et citrinine.

Parmi les facteurs affectant la production de mycotoxines dans une denrée, il faut distinguer les facteurs intrinsèques liés à la souche fongique et les facteurs extrinsèques constitués par l'ensemble des conditions écologiques (facteurs environnementaux).

3.1. Facteurs intrinsèques

Le métabolisme secondaire n'est pas commun à toutes les espèces fongiques, mais spécifique d'une espèce, voire même d'une souche fongique et de ses caractéristiques génétiques. Au sein d'une même espèce toxigène, la capacité de production n'est pas présente chez toutes les souches. Certaines mycotoxines sont étroitement liées à certaines espèces fongiques. D'autres sont, au contraire élaborées par des espèces appartenant à des genres différents. Ainsi, l'ochratoxine A (OTA) et la patuline sont produites par *Penicillium* et *Aspergillus*. Inversement, plusieurs mycotoxines peuvent être produites par une même espèce fongique selon le substrat utilisé et les facteurs environnementaux (ex. : aflatoxines, acide cyclopiazonique, aspertoxine, etc., produites par *Aspergillus flavus*). La fréquence des souches toxigènes dépend de l'espèce fongique considérée, de la distribution du potentiel toxigène au sein de l'espèce et parfois du substrat d'origine et de la région.

3.2. Facteurs environnementaux ou facteurs extrinsèques

La figure 1, montre les principaux facteurs qui influencent la croissance du champignon et la production de mycotoxines. La température et l'humidité sont les deux facteurs physiques ayant une influence considérable sur la croissance et la production de mycotoxines (Mitchell *et al.*, 2004). Les champignons de champs sont plus exigeants du point de vue humidité du substrat (22-25 %) par rapport aux champignons de stockage (13-18 %) (Samson *et al.*, 2000). Les types de mycotoxines que l'on peut rencontrer dans les céréales et d'autres produits d'origine végétale est fonction des conditions climatiques qui favorisent le développement de certaines espèces toxigènes et la formation de leurs mycotoxines. A titre d'exemple, les mycotoxines retrouvées dans les céréales des régions à climat froid sont différentes de celles retrouvées dans les pays chauds. Il faut également souligner que la production de certaines mycotoxines n'est pas strictement liée à la croissance des moisissures productrices. Les conditions de croissance des champignons sont moins exigeantes que les conditions de production des mycotoxines. Par exemple *Aspergillus ochraceus* peut croître à une activité de l'eau (a_w) = 0,77, alors que la production d'OTA exige une $a_w \geq 0,85$. Pour chaque toxine, il convient donc de se reporter aux conditions limites de croissance des espèces fongiques correspondantes.

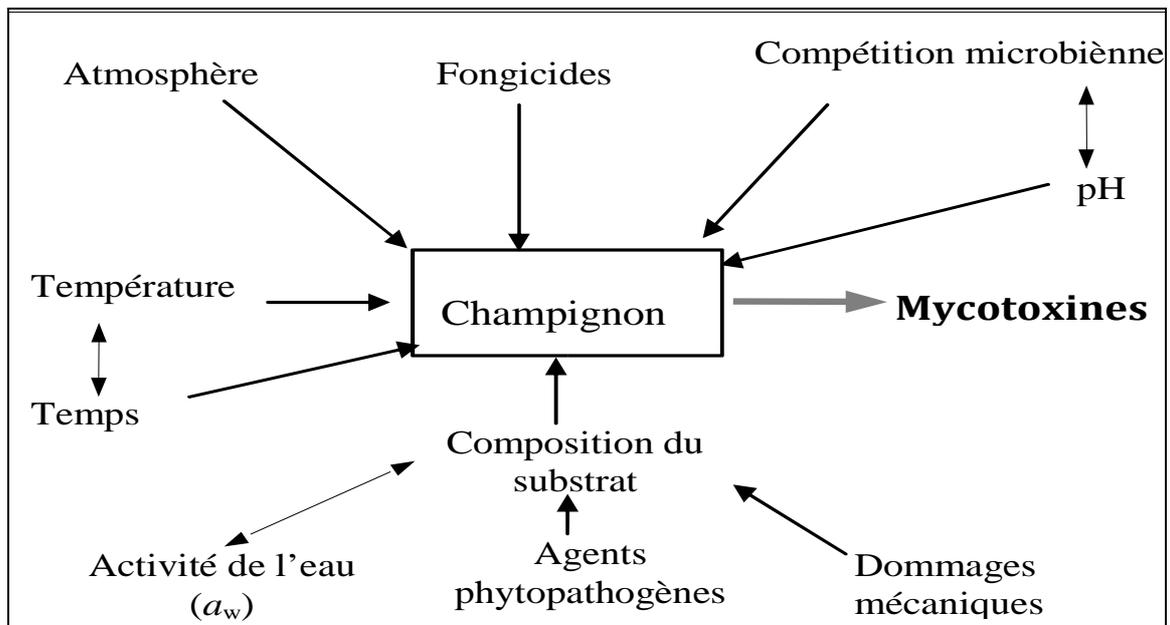


Figure 1. Facteurs environnementaux influençant la production des mycotoxines.

3.2.1. Température

La température optimale de toxinogénèse est, en général, voisine de la température optimale de croissance. À l'image du champignon producteur, les mycotoxines peuvent être produites sur une large gamme de température. Par exemple, les aflatoxines peuvent être synthétisées entre 12-42°C avec un optimum entre 24-28°C (Reiss *et al.*, 1998). *Aspergillus flavus* et *A. niger* peuvent se développer entre 8 et 45 °C (Pitt et Hocking, 1997). À 5°C, *Aspergillus* ne peut produire ni les aflatoxines, ni l'OTA, alors que *Penicillium* et *Fusarium* sont capables de produire les mycotoxines (Northolt et Bullerman, 1982; Weidenbörner 1998).

3.2.2. Activité de l'eau

La teneur en eau libre dans un substrat, appelée activité de l'eau (a_w), est l'un des facteurs déterminants dans la production des mycotoxines. Certains facteurs, tels que la pression osmotique, le substrat et la température, en réduisant l'humidité relative, peuvent conditionner l' a_w dans le milieu. La plupart des champignons se développent à une a_w de 0,8. En général, l' a_w optimale pour la production de mycotoxines est supérieure à celle de la croissance du champignon. Les champignons xérophiles peuvent se multiplier à des a_w allant de 0,75 - 0,65 et peuvent sporuler dans les produits de faibles a_w (grains, noix, fruits secs, herbes, etc.) (Weidenbörner, 1998). Les produits alimentaires ayant une $a_w \leq 0,6$ ne sont généralement pas altérés.

3.2.3. Influence du pH

La plupart des champignons peuvent croître entre pH 2,5 et 9,5 avec un optimum de 4,5 à 6,5 et la production des mycotoxines a lieu aux voisinages des pH optimum de croissance (Weidenbörner, 1998).

3.2.4. Composition gazeuse

Les concentrations en oxygène (O₂) et en dioxyde de carbone (CO₂) dans l'atmosphère et tout particulièrement la teneur en O₂ dans le substrat, jouent un rôle important dans la croissance et la production de mycotoxines chez de nombreuses moisissures (Frisvad et Samson, 1991). Les teneurs en ces gaz diffèrent d'une espèce à une autre. En général, la réduction de la pression partielle en oxygène et, surtout, l'accroissement de la teneur en CO₂, ont un effet dépresseur bien plus important sur la toxino-genèse que sur la croissance chez les espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Taniwaki *et al.* (2001) ont montré qu'une teneur de 40% en CO₂ et 1% en O₂ réduit de 65% la croissance d'*A. flavus* et une inhibition totale de la production d'aflatoxine B1. En outre, la production d'aflatoxine B1 sur de l'arachide, modérément réduite entre 21 et 5 % d'O₂, n'est pratiquement inhibée que lorsque la proportion en O₂ est inférieure à 1%. Une augmentation de la teneur en CO₂ (20%), surtout si elle est corrélative d'une réduction en oxygène, provoque une chute importante en aflatoxines. Toutefois, dans une atmosphère confinée, telle qu'elle se présente dans un ensilage mal tassé, *Fusarium roseum* peut encore élaborer de la zéaralénone. *Byssochlamys nivea* produit de la patuline même en anaérobiose. Après conservation dans une atmosphère confinée, dans lesquelles les moisissures peuvent plus ou moins se développer, la remise à l'air libre ou la ventilation provoquent rapidement une intense toxino-genèse.

3.2.5. Nature du substrat

Parmi les produits et aliments d'origine végétale, les céréales et leurs produits dérivés sont les plus fréquemment contaminés par les champignons toxino-gènes. Les autres produits contaminés d'origine végétale sont les fruits et légumes secs (graines oléagineuses, haricots et raisins secs), les épices, le café, le cacao et les produits de fermentation (jus de pomme, jus de raisin, bière, vin et cidre). Bien que la toxino-genèse dépende beaucoup plus étroitement de la croissance du champignon que de la composition chimique du substrat, ce dernier semble jouer un rôle non négligeable. En effet, les céréales et les oléagineux, plus riches en hydrates de carbone et en lipides, sont généralement plus favorables à la production de mycotoxines que les substrats à forte teneur en protéines (Le Bars, 1998). Ainsi, la biogénèse des aflatoxines, de l'ochratoxine A, de la stérigmatocystine et de l'acide pénicillique (c'est-à-dire les dérivés de la voie des polycétoacides), est plus importante dans les milieux riches en glucides et en lipides que dans les milieux à forte

teneur en protides (Lacey, 1989). La production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* est favorisée par certains sucres: le glucose, le mannose, le fructose et le saccharose. En outre, *Aspergillus parasiticus* ne produit pas d'aflatoxines dans un milieu peptoné riche en sel (Barrios-Gonzalez et Tomasini,1996). Mais il peut y avoir des interactions plus ou moins spécifiques entre certains composés d'origine végétale ou fongique. Ainsi, le fait que le soja ne se prête pas à l'accumulation d'aflatoxine peut s'expliquer par la présence d'acide phytique qui complexe le zinc, indispensable à la biosynthèse des aflatoxines (Pfohl-Leszkowicz,1999).

3.2.6. Facteurs biologiques

Parmi les facteurs biologiques ayant une influence sur la production des mycotoxines, on peut distinguer l'effet positif exercé par les prédateurs et l'effet inhibiteur *via* la compétition microbienne.

- les prédateurs: les insectes et les acariens sont des vecteurs de spores de moisissures qu'ils introduisent à l'intérieur même du grain par les lésions qu'ils créent. Ainsi, la contamination d'arachide, de coton et de maïs par *A. flavus* et/ou les aflatoxines avant la récolte est souvent liée à l'attaque par les insectes. Les prédateurs interviennent aussi au cours de la conservation; les échantillons de grain hébergeant des charançons révèlent en général une population fongique importante et parfois des mycotoxines (aflatoxine B1, ochratoxine A et citrinine dans du maïs ou de l'orge) (Murphy *et al.*, 2006). Au cours de la conservation de réserves de céréales non protégées, les oiseaux et les rongeurs interviennent de manière similaire.

- Compétition microbienne: la présence de microorganismes compétitifs peut contribuer à une réduction de la croissance du champignon et à la production de mycotoxines. Ainsi, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer* ou les bactéries lactiques ont montré une capacité à réduire et/ou à inhiber la production d'aflatoxines (Weidenbörner, 2001). En effet, l'association d'espèces fongiques à une souche toxigène a généralement un effet dépressif sur la production de toxine en raison d'une compétition pour le substrat, d'une part, et du pouvoir de dégradation de la toxine par certains microorganismes, d'autre part. En effet, les échantillons envahis par une seule espèce présentent généralement une imprégnation toxique bien plus importante que les échantillons ayant une mycoflore complexe.

3.3. Facteurs chimiques

L'emploi d'insecticides réduit l'apparition de mycotoxines, soit par action antifongique directe sur le champignon, soit en prévenant les lésions au niveau des graines dues aux insectes et aux acariens. Si les fongicides utilisés au champ ou employés en tant qu'additifs ou agents de conservation sont appliqués avec succès, le risque de contamination en mycotoxines est faible. Il

convient toutefois d'être prudent dans l'emploi de ces substances. En effet, certaines études ont montré qu'à concentration sub-létale, la production de mycotoxines est favorisée (Le Bars, 1988).

4. Effets sur la santé

Les mycotoxines sont des molécules très toxiques pour l'Homme et l'animal. La palette de leurs effets toxiques est très étendue: effets cancérogènes, mutagènes, tératogènes, immunosuppresseurs, allergiques, oestrogéniques, nécrosants, neurotoxiques, néphrotoxiques, etc. Les organes et tissus cibles sont très divers: foie, reins, peau, système immunitaire, système nerveux, glandes endocrines, etc., où des lésions organiques irréversibles peuvent être produites. Contrairement aux toxines bactériennes dont les effets sont immédiats (souvent entre 12 et 36 h après ingestion des aliments contaminés), les mycotoxines ont des effets insidieux, qui se manifestent à plus ou moins long terme (quelques mois à quelques années). Les articles faisant le point sur les effets néfastes des mycotoxines sont nombreux (Peraica *et al.*, 1999; Hussein et Brasel, 2001; Bennett et Klich, 2003).

Certaines toxines exercent un pouvoir hépatotoxique (aflatoxines), d'autres se révèlent oestrogéniques (zéaralénone), immuno/hématotoxiques (patuline, trichothécènes, fumonisines), dermonécrosantes (trichothécènes), néphrotoxiques (ochratoxine A) ou neurotoxiques (patuline). Le tableau 4 résume les effets et les mécanismes d'action des principales mycotoxines. Certaines d'entre elles sont reconnues ou suspectées d'être cancérogènes. En outre, plusieurs mycotoxines peuvent être présentes dans le même produit ou la même ration alimentaire.

Nous reviendrons sur les effets des aflatoxines et de l'OTA de façon plus détaillée dans les chapitres consacrés à ces toxines.

5. Méthodes de détection des mycotoxines dans les aliments

Les méthodes disponibles pour l'évaluation des risques liés à la présence des mycotoxines sont celles qui permettent le dosage direct des mycotoxines. Les protocoles destinés à la quantification des mycotoxines incluent des étapes d'extraction, de purification et de concentration. L'analyse proprement dite comprend la détection, la quantification et la confirmation. Elle fait intervenir des techniques chromatographiques:

- Chromatographie en couche mince (CCM).
- Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).
- Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) ou HPLC couplée à l'ionisation par électrospray (ESI).

Tableau 4. Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement (AFSSA, 2006).

Toxine	Effets	Mécanismes d'action cellulaire et moléculaire
Aflatoxine B1+ M1	Hépatotoxicité. Génotoxicité. Cancérogénicité. Immunomodulation.	Formation d'adduit à l'ADN. Péroxydation lipidique. Bioactivation par le cytochrome P450. Conjugaison aux GS-transférases.
Ochratoxine A	Néphrotoxicité. Génotoxicité. Immunomodulation.	Impact sur la synthèse des protéines. Inhibition de la production d'ATP. Détoxification par les peptidases.
Patuline	Neurotoxicité. Mutagenèse <i>in vitro</i> .	Inhibition indirecte d'enzymes.
Trichothécènes (toxine T-2, déoxynivalénol, etc.)	Hématotoxicité. Immunomodulation. Toxicité cutanée.	Induction de l'apoptose sur progéniteur. Tissu hématopoïétique et cellules immunitaires. Impact sur la synthèse des protéines. Altération des immunoglobulines.
Zéaralénone	Fertilité et reproduction.	Liaison aux récepteurs oestrogéniques. Bioactivation par des réductases. Conjugaison aux glucuronyltransférases.
Fumonisine B1	Lésion du système nerveux central. Hépatotoxicité. Génotoxicité. Immunomodulation.	Inhibition de la synthèse de céramide. Altération du rapport sphinganine/sphingosine. Altération du cycle cellulaire.

La CCM présente l'intérêt de pouvoir détecter plusieurs toxines simultanément, mais les limites de détection sont trop élevées pour détecter des teneurs définies par les réglementations. Les techniques LC-MS ou ESI demeurent actuellement peu utilisées car ces technologies sont très coûteuses tant par l'acquisition de l'appareillage que par son entretien. La technique, la plus employée avec la CCM est l'HPLC (C.A.S.T, 2003), couplée à un détecteur UV ou par fluorimétrie. D'autres méthodes utilisent les techniques immunochimiques (RIA, ELISA) permettant une détection qualitative ou semi-quantitative.

6. Réglementation

L'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S) a récemment reconnu que la contamination des produits d'alimentation par les mycotoxines constitue une source importante de maladies d'origine alimentaire (O.M.S, 2002). Conscients des effets graves que peuvent avoir ces toxines naturelles, de nombreux pays ont adopté ces dernières années des réglementations relatives aux mycotoxines dans les produits d'alimentation humaine et animale.

Les premières limites pour les mycotoxines ont été fixées à la fin des années 60 pour les aflatoxines. À la fin de 2003, une centaine de pays avaient élaboré des limites spécifiques pour les mycotoxines dans les aliments et leur nombre continue de progresser (F.A.O, 2004). Il existe un certain nombre de publications axées sur les limites et réglementations pour les mycotoxines (Resnik *et al.*, 1991; Boutrif et Canet, 1998; Rosner, 1998; Van Egmond, 1999).

L'établissement de réglementations en matière de mycotoxines est une opération très complexe, dans laquelle de nombreux facteurs entrent en jeu. En effet, plusieurs facteurs, d'ordre scientifique et socioéconomique, peuvent avoir une incidence sur l'établissement de valeurs limites et de réglementations concernant les mycotoxines. Il s'agit des facteurs suivants:

- disponibilité de données toxicologiques;
- disponibilité de données sur la présence de mycotoxines dans divers produits;
- connaissance de la répartition des concentrations de mycotoxines dans un lot;
- disponibilité de méthodes d'analyse;
- législation des pays avec lesquels des contacts commerciaux existent;
- nécessité d'un approvisionnement alimentaire suffisant.

Selon A.F.S.S.A (2006), le classement établi par le centre international de recherche sur le cancer (préambule des monographies C.I.R.C –19 janvier 1999) est textuellement le suivant:

- Groupe 1: L'agent (le mélange) est cancérigène pour l'homme. Les circonstances d'exposition donnent lieu à des expositions qui sont cancérigènes pour l'homme.

- Groupe 2A: L'agent (le mélange) est probablement cancérigène pour l'homme. Les circonstances d'exposition donnent lieu à des expositions qui sont probablement cancérigènes pour l'homme.
- Groupe 2B: L'agent (le mélange) est peut-être cancérigène pour l'homme. Les circonstances d'exposition donnent lieu à des expositions qui sont peut-être cancérigènes pour l'homme.
- Groupe 3: L'agent (le mélange, les circonstances d'exposition) ne peut être classé quant à sa cancérigénicité pour l'homme (les études ne peuvent pas être interprétées en terme de présence ou d'absence d'effet cancérigène en raison de limites qualitatives ou quantitatives importantes, ou aucune donnée expérimentale de cancérigénicité n'est disponible).
- Groupe 4: L'agent (le mélange) n'est probablement pas cancérigène pour l'homme

6.1. Réglementation relative aux aflatoxines

En l'état actuel, les connaissances scientifiques et techniques ne peuvent assurer l'élimination totale des moisissures et en conséquence, la présence de mycotoxines dans les denrées alimentaires. En 1993, le C.I.R.C a classé l'AFB1 dans le groupe 1, l'AFM1 dans le groupe 2B et l'AFG1 dans le groupe 3. Les substances cancérigènes et génotoxiques présentent des effets sans seuil. Pour ces substances, il n'existe pas un seuil pour lequel il ne peut pas y avoir un risque. C'est pourquoi, il est difficile de fixer de dose journalière tolérable (DJT) pour les aflatoxines (A.F.S.S.A, 2006). Il y'a donc lieu de fixer des limites au niveau le plus bas possible afin de réduire l'exposition à un niveau aussi faible qu'il soit raisonnablement possible de l'être. C'est le principe ALARA (As Low As Reasonably Achievable), défini comme le niveau le plus faible d'un contaminant qui ne peut pas être éliminé d'un aliment.

Les mesures réglementaires en vigueur dans l'Union européenne sont des plus sévères. Dans le cadre du règlement 1881/2006/CE (abrogeant le règlement 466/2001/CE et ses modifications) portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires et de la directive 2002/32 (et ses modifications) sur les substances indésirables dans les aliments pour animaux, des teneurs maximales ont été fixées pour les aflatoxines (Tableau 5).

Limites mondiales relatives aux aflatoxines

Un document intitulé : « Réglementations relatives aux mycotoxines dans les produits d'alimentation humaine et animale, à l'échelle mondiale en 2003 » a été établi par l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (F.A.O, 2004). Selon ce document, le nombre des pays qui réglementent les aflatoxines augmente sensiblement au fil des ans. Les

Tableau 5. Teneurs maximales en aflatoxines exprimées en µg/kg dans l'Union Européenne (règlement 1881/2006/CE).

Alimentation	Toxine	Denrée alimentaire	Teneur maximale en µg/kg
Humaine	Aflatoxine B1	Arachides (cacahuètes) + autres graines + fruits secs.	2,5 - 8 selon le produit et son stade de transformation
		Certaines épices.	5
		Préparations à base de céréales et aliments pour nourrissons et enfants en bas âge.	0,1
	Aflatoxines B1+B2+G1+G2	Arachides (cacahuètes) + autres graines + fruits secs.	4,1 - 15 selon le produit et son stade de transformation
		Céréales.	4 - 10 selon le produit et son stade de transformation
		Certaines épices.	10
		Lait.	0,05
		Aflatoxine M1	Préparations pour nourrissons et enfants en bas âge.
Matières premières des aliments pour animaux.	20		
Animale	Aflatoxine B1	Aliments complets/complémentaires.	5 – 20 selon les espèces animales

réglementations concernant les aflatoxines sont détaillées et applicables à des produits d'alimentation humaine, à des produits laitiers ou à des produits d'alimentation animale spécifiques.

Le tableau 6 représente des comparaisons des valeurs médianes, des intervalles de variation et le nombre de pays ayant fixé des limites légales pour les aflatoxines présentes dans les produits d'alimentation humaine ou animale pour les années 1995 et 2003. Cette comparaison est toutefois difficile à réaliser compte tenu de l'incertitude de certaines données et de la réglementation qui n'est pas uniforme pour tous les pays. En effet, certains pays disposent de multiples réglementations précisant différents seuils de tolérance pour divers produits d'alimentation humaine ou animale, tandis que d'autres ont fixé un seuil de tolérance unique, par exemple, pour tous les produits "d'alimentation humaine" ou pour tous les produits "d'alimentation animale".

Les niveaux maximaux tolérés pour l'aflatoxine B1 dans les produits d'alimentation humaine n'ont pas changé entre 1995 et 2003. La limite relativement répandue est celle de 5 µg/kg. En 2003, comme en 1995, de nombreux pays avaient fixé des limites pour la somme des aflatoxines B1, B2, G1 et G2, en y ajoutant parfois une limite spécifique pour l'aflatoxine B1. La question de savoir si une limite réglementaire pour la somme des aflatoxines permet de mieux protéger la santé publique qu'une limite pour la seule aflatoxine B1 reste posée. En effet, l'aflatoxine B1 est la plus fréquente et la plus toxique alors que les aflatoxines B2, G1 et G2 sont rares dans les produits de base (Yabe et Nakajima, 2004). En général, le rapport des fréquences relatives des aflatoxines B1 et B2 est, en moyenne, de 4:1. Pour l'aflatoxine B1 et la somme des aflatoxines B2, G1 et G2 le rapport des fréquences relatives se situe en général aux alentours de 1:0,8 (Van Egmond *et al.*, 1978). Il semblerait que l'analyse de l'aflatoxine B1 soit efficace, suffisante et plus pratique.

En ce qui concerne l'Algérie, les limites maximales tolérées d'aflatoxines dans les produits d'alimentation humaine et animale (F.A.O, 2004) sont données dans le tableau 7.

6.2. Réglementation relative à l'ochratoxine A

De nombreux pays ont fixé une concentration maximale pour l'ochratoxine A dans les céréales, considérées comme la principale source d'exposition humaine à cette mycotoxine. Certains pays l'ont fait pour les produits à base de céréales et d'autres ont fixé des limites différentes pour les céréales et leurs dérivés. Ainsi, de toutes les régions du monde, les pays de l'Union Européenne (UE) possèdent les réglementations les plus étendues et les plus précises en ce qui concerne les mycotoxines présentes dans l'alimentation humaine. Dans le cadre du règlement 1881/2006/CE (abrogeant le règlement 466/2001/CE) portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, des teneurs maximales ont été fixées pour l'OTA (Tableau 8).

Tableau 6. Valeurs médianes et intervalles de variation des niveaux maximaux tolérés en 1995 et 2003 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) des aflatoxines et nombre de pays disposant de réglementations (F.A.O, 2004).

Année	1995			2003		
	Valeur médiane ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Intervalle de variation ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Nombre de pays	Valeur médiane ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Intervalle de variation ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Nombre de pays
Aflatoxine B1 dans les produits	4	0-30	33	5	1-20	61
Aflatoxines B1+B2+G1+G2 dans les produits d'alimentation humaine.	8	0-50	48	10	0-35	76
Aflatoxine M1 dans le lait.	0,05	0-1	17	0,05	0,05-15	60
Aflatoxine B1 dans les produits d'alimentation animale.	5	5-50	25	5	5-50	39
Aflatoxines B1+B2+G1+G2 dans les produits d'alimentation animale.	20	0-1000	17	20	0-50	21

Tableau 7. Limites réglementaires algériennes des aflatoxines dans les produits d'alimentations humaine et animale (données de 2003), (F.A.O. (2004)^a.

Produits	Somme des Mycotoxines	Limite ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Méthode d'échantillonnage	Méthode d'analyse
Produits d'alimentation humaine				
Arachides, fruits à coque, céréales	Aflatoxine B1	10	Non officielle	Officielle (DZ ₁) ^b
	Aflatoxines B1, B2, G1 et G2	20		
Produits d'alimentation animale				
Aliments pour bétail	Aflatoxine B1	20	Non officielle	Officielle (DZ ₂) ^c

^aLes données ont été fournies par le Ministère du commerce algérien.

^bAOAC (1990). 986.22. Aflatoxins in peanuts and peanuts products – CB method Food and Drug Laboratories– Canada – Best food method.

^cDZ₂ NF-VF (1980). Animal feed – aflatoxins measurement B1, June 1980:18-200.

Tableau 8. Teneurs maximales en ochratoxine A dans les denrées alimentaires exprimées en $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Règlement (C.E) No 1881/2006 de la commission du 19 décembre 2006).

Denrée alimentaire	Teneur maximale ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Grains de céréales brutes (y compris le riz brut et le sarrasin).	5
Produits dérivés des céréales (y compris les produits de céréales transformés et les grains de céréales destinés à la consommation directe).	3
Préparation à base de céréales pour enfants en bas âge et aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales spécifiquement pour les nourrissons.	0,5
Raisins secs (Corinthe, sultanines et autres raisins secs).	10
Grains de café torréfié et café torréfié moulu.	5
Café soluble (instantané).	10
Vin (rouge, blanc et rosé et autres boissons à base de vin et/ou de moût de raisins).	2
Jus de raisin, ingrédients à base de jus de raisin dans d'autres boissons, y compris le nectar de raisin et le jus de raisin concentré reconstitué.	2

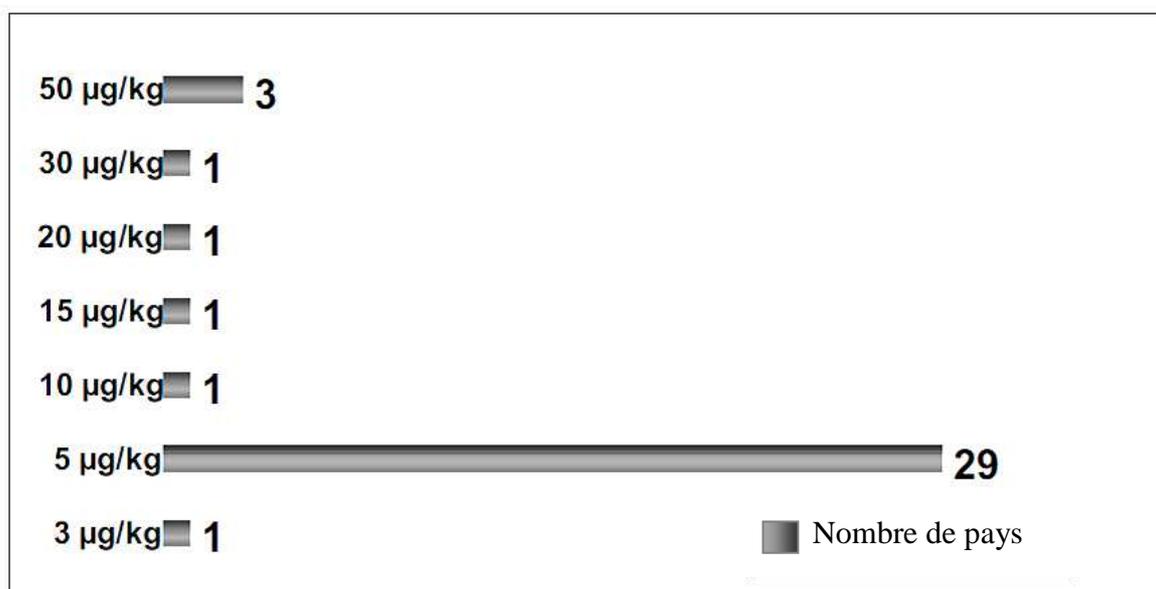


Figure 2. Concentrations maximales pour l'ochratoxine A dans les céréales et les produits céréaliers, à l'échelle mondiale (F.A.O, 2004).

Le 4 avril 2006, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESAs), à la demande de la commission, a adopté un avis scientifique actualisé sur l'OTA dans les aliments, qui, sur la base des nouvelles informations scientifiques disponibles, a établi une dose hebdomadaire tolérable (DHT) de 0,12 µg/kg de poids corporel. Outre les pays européens, certains pays ont fixé des teneurs en OTA allant de 3 à 50 µg/kg (Figure 2). Aucune teneur maximale en OTA n'est encore fixée dans les aliments pour animaux. Cependant, la Commission (Recommandation 2006/576/CE de la Commission du 17 août 2006) recommande d'appliquer des teneurs maximales en OTA dans les matières premières et aliments destinés à l'alimentation animale. La plupart des réglementations existantes en matière de mycotoxines en Afrique se rapportent aux aflatoxines. L'Algérie n'a, à notre connaissance, pas encore fixé les teneurs maximales en ochratoxine A dans les aliments.

7. Stratégies de prévention contre la contamination par les mycotoxines

La meilleure stratégie pour garantir la sécurité sanitaire des aliments vis-à-vis de la présence de mycotoxines dans les aliments, consiste à appliquer les règles pratiques permettant de limiter la survenue de ces contaminants. Bien que les facteurs environnementaux soient déterminants dans la survenue des contaminations par les moisissures et leurs mycotoxines, toutefois, la maîtrise des étapes pré-récolte, post-récolte et de stockage permet de réduire la contamination (Lacey, 1989). La réduction des contaminations repose sur la stratégie préventive qui consiste à mettre en place un plan de contrôle et d'analyse des points critiques (HACCP, Hazard Analysis Critical Control Point). Cette méthode consiste en une identification des risques alimentaires potentiels au cours d'une opération. La démarche est basée sur le développement d'une stratégie de prévention, de contrôle, de bonnes pratiques agricoles et de contrôle de la qualité à toutes les étapes de la production. Il s'agit de mettre en évidence les points à risques, ainsi que les points critiques, de mettre en place des solutions afin de gérer au mieux le risque, ainsi que de développer des méthodes de suivi et de vérification.

En ce qui concerne la gestion du risque lié à la contamination, le suivi des bonnes pratiques agricoles doit permettre de réduire de manière significative la contamination. Il s'agit de s'assurer de la bonne qualité sanitaire du grain, du site de stockage, du nettoyage des équipements et de la bonne hygiène du personnel. En cours de stockage, le taux de contamination doit être suivi, et les denrées contaminées doivent être isolées afin d'empêcher les contaminations croisées.

Les pratiques à observer et les démarches à suivre pour le suivi des bonnes pratiques agricoles sont décrites ci-après:

7.1. Pratiques précédant la récolte

Il faut d'abord réduire autant que possible la présence d'inoculum à proximité de la plante en éliminant tous les restes des cultures précédentes, ainsi que tout substrat qui serait propice à la croissance de champignons producteurs de mycotoxines. La rotation des cultures est dans ce cas un élément important (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Il faut souligner que les plantes stressées sont plus susceptibles à la contamination par les moisissures et les mycotoxines. La semaison, tout comme la récolte, doivent être effectuées à une période où ne sévissent pas des conditions de températures trop élevées ou des conditions de sécheresse, celles-ci contribuant au stress de la plante. Il est recommandé de réduire autant que possible les dommages causés par les insectes ainsi que les infections fongiques, et ce, par l'usage approprié d'insecticides et de fongicides. Il est recommandé que le grain soit récolté à pleine maturité et que les dommages mécaniques, liés à la récolte, soient limités autant que possible.

7.2. Pratiques de stockage

Les mesures les plus efficaces pour lutter contre les mycotoxines consistent à ramener la teneur en eau à un seuil trop faible pour inhiber le développement de moisissures et/ou empêcher la production de mycotoxines. En général, l'activité de l'eau (a_w) doit être inférieure ou égale à 0,70 ce qui correspond à une teneur en eau d'environ 14% pour les grains de céréales (maïs, blé, etc.) et 7,0% pour les arachides à une température de 20°C. Les moisissures colonisant les denrées au cours du stockage, comme le genre *Aspergillus*, ont la capacité de se développer pour des taux d'humidité compris entre 10 et 18% (Lillehoj et Elling, 1983). La température joue également un rôle déterminant dans le développement fongique ainsi que dans la mycotoxinogénèse. Cependant, les conditions optimales de température et d'humidité relatives pour la croissance fongique diffèrent de celles optimales pour la mycotoxinogénèse (Steyn, 1984; Suárez-Quiroz *et al.*, 2004). La surveillance de l'évolution de la température au cours du stockage peut être révélatrice du développement de moisissures. Une variation de 2 à 3°C de la température peut être le signe d'un développement microbien. D'autres facteurs, tels que les conditions climatiques avant et pendant la récolte, l'état physique du grain et la température au moment de la récolte, peuvent influencer le développement des moisissures et la formation de mycotoxines (Pfohl-Leszkowicz, 1999b; Molinié et Pfohl-leszkowicz, 2002; Magan et Aldred, 2005; Scudamore, 2005).

En cas de contamination par des champignons d'une précédente récolte stockée, il est recommandé d'assainir les locaux par des traitements chimiques et d'équilibrer et d'abaisser la température; au cours du stockage, la cellule doit être sèche et ventilée pour limiter la condensation (Scudamore, 2005). Les grains infectés seront séparés des grains sains et des prélèvements seront constitués pour analyse. Il faut cependant souligner que le suivi de ces bonnes pratiques agricoles

n'est toujours pas suffisant pour empêcher la contamination. Des stratégies de décontamination se sont développées pour faire face à ce problème.

7.3. Stratégie curative: la décontamination

Afin de réduire les contaminations des aliments par les moisissures et leurs mycotoxines, de nombreux procédés biologique, chimique et physique ont été proposés (Doyle *et al.*, 1982; O.M.S, 2002). Un procédé de décontamination des mycotoxines dans les denrées alimentaires doit permettre la destruction ou l'élimination de la toxine sans pour autant laisser de résidu toxique et sans modifier la qualité nutritive et les propriétés technologiques de façon significative du produit (Park, 1993).

L'une des stratégies consiste à limiter les effets toxiques des mycotoxines par l'ingestion d'agents chélateurs de la toxine tels que la cholestyramine ou les aluminosilicates de sodium et de calcium hydratés (Huff *et al.*, 1992; Huwig *et al.*, 2001), ou par l'ajout d'additifs alimentaires (vitamines, graines de sésame, aspartame, mélatonine, piroxicam ou acides lactique et sorbique) contribuant à une protection partielle de l'organisme à la toxicité (Galvano *et al.*, 2001). D'autres composés comme les propionates, les benzoates (Punja et Grogan, 1982) et les sels de bicarbonates (Montville et Shih, 1991) ont également été utilisés.

L'ammonification est l'un des procédés chimiques les plus utilisés avec succès dans la détoxification des aflatoxines dans diverses matières premières ((Park *et al.*, 1988). Le traitement par l'ammoniac inactive les aflatoxines en rompant la fonction lactone. L'ammonification n'est pas efficace pour l'élimination de l'OTA car celle-ci est transformée en sa forme ouverte qui redonnera par la suite l'OTA originelle dans les conditions acides de l'estomac (Chelkowski *et al.* 1981, Castegnaro *et al.*, 1991). Il est à noter que les traitements chimiques ne sont pas autorisés pour la décontamination des aliments destinés à l'alimentation humaine.

L'emploi des différentes techniques de cuisson a également fait l'objet de nombreuses publications. Selon Buser et Abbas (2002), le taux d'aflatoxines diminue de 33% par le procédé d'extrusion, alors que la cuisson à vapeur des arachides fait diminuer de 40% la teneur en aflatoxines. Divers procédés de cuisson ont récemment été testés par Hwang et Lee (2006). L'implication des composés phénoliques dans la résistance de certaines variétés de plantes (McKeehen *et al.*, 1999; El Modafar *et al.*, 2000; Siranidou *et al.*, 2002) a suscité un intérêt particulier pour leur utilisation dans la lutte contre les champignons toxigènes durant le stockage (Samapundo *et al.*, 2007).

Parmi les stratégies de lutte biologique contre les contaminations avant la récolte, on peut citer l'utilisation des bactéries endophytes telles que *Bacillus mojavensis* et *B. subtilis* (Bacon *et al.*,

2001), l'utilisation des souches d'*A. flavus* non toxigènes (Abbas *et al.*, 2006) et l'emploi des cultivars moins sensibles aux infections (O.M.S, 2002; C.A.S.T, 2003).

De nombreux travaux ont été consacrés à la recherche de bactéries probiotiques (Peltonen *et al.*, 2000) et d'autres bactéries antagonistes pouvant éliminer l'aflatoxine B1. Cependant, très peu d'études ont rapporté la dégradation effective de l'AFB1 par les microorganismes. Les bactéries ayant prouvé des capacités à dégrader cette toxine sont: *Nocardia corynebacteroides* (anciennement *Flavobacterium aurantiacum*) (Ciegler *et al.*, 1996), *Mycobacterium fluoranthenvivorans* (Hormisch *et al.*, 2004) et tout particulièrement *Corynebacterium rubrum* (Shih et Marth, 1975; Mann et Rehm, 1977). En outre, Teniola *et al.* (2005) et Alberts *et al.* (2006) ont récemment rapporté la dégradation de l'AFB1 par des cultures de *Rhodococcus erythropolis*. Cette bactérie aérobie Gram positif est en effet capable de dégrader divers composés aromatiques (Kitova *et al.*, 2004) et aurait un rôle dans l'élimination de certains polluants aromatiques dans l'environnement (Sakai *et al.*, 2003).

8. Le blé

8.1. Description et caractéristiques botaniques

Le blé est une plante herbacée monocotylédone qui appartient au genre *Triticum* et à la famille des Graminées. Les deux espèces qui dominent sont le blé dur (*Triticum durum*) et le blé tendre (*Triticum aestivum*). Le grain de blé est un fruit sec, dont le nom botanique est caryopse, de forme ovoïde et présente sur la face ventrale un sillon qui s'étend sur toute la longueur. Sa couleur varie du roux au blanc. A la base dorsale du grain, se trouve le germe qui est surmonté par une brosse. Le grain de blé mesure entre 5 et 7 mm de long, et entre 2,5 et 3,5 mm d'épaisseur, pour un poids compris entre 20 et 50 mg. La structure du grain de blé est présentée dans la figure 3. La composition moyenne en protéines, en glucides, en lipides et en éléments minéraux du grain de blé, est décrite dans le tableau 9.

Le blé dur est utilisé pour la fabrication de la semoule, des pâtes alimentaires, du couscous et des pains, alors que le blé tendre est utilisé en meunerie pour l'obtention de la farine destinée à la panification (Popineau et Denery-Panini, 1996). Il existe aujourd'hui plus de 20 000 variétés de blé au niveau mondial, variétés adaptées à différents milieux, et développant une résistance envers certains pathogènes et maladies du blé. Au niveau mondial, la production de blé arrive en seconde place, après le maïs.

Les régions bénéficiant d'un climat relativement sec, aux journées chaudes et aux nuits fraîches, conviennent le mieux à la production du blé dur. Ces conditions confèrent aux grains une grande vitrosité et dureté, qualités qui assurent aux produits à base de blé dur un excellent comportement de cuisson. C'est pourquoi la production et la consommation des produits à base de

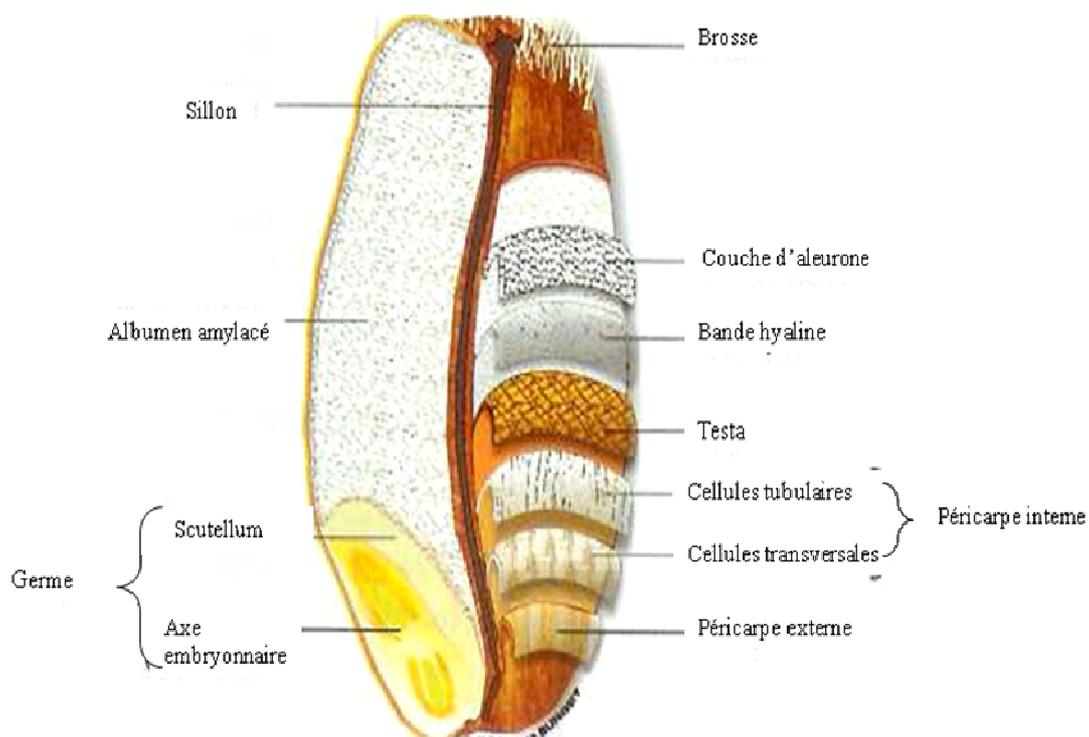


Figure 3. Structure du grain de blé (Surget et Barron, 2005).

Tableau 9. Composition du blé en divers éléments, exprimée en % de la matière sèche (Surget et Barron, 2005).

Nature du composant	Teneur en % de la matière sèche
Protéines	10-15
Amidon	67-71
Pentosanes	8-10
Cellulose	2-4
Sucre libre	2-3
Lipides	2-3
Matières minérales	1,5-2,5

blé dur ont commencé dans les régions chaudes et sèches méditerranéennes de l'Afrique du Nord de l'Europe méridionale, de la Turquie et de la Syrie. Dans ces régions, le blé dur constitue l'aliment de base consommé surtout sous forme de plats traditionnels à base de semoule (couscous, pains, etc.).

En Algérie, la céréaliculture est pratiquée sur de grandes superficies non irriguées d'où une grande variation en matière de production annuelle estimée entre 1 et 4,5 millions de tonnes. La céréaliculture occupe annuellement une superficie allant de 3 à 3,5 millions d'hectares. Le blé dur occupe 43 % de la surface de production agricole du pays, suivi du blé tendre, qui en occupe 19 %. Ces dernières années, il y a eu accroissement de la production de céréales, grâce à un niveau satisfaisant de précipitations et à l'application d'un programme national d'intensification des cultures. A titre d'exemple, la récolte de 2007 a été estimée à 4,3 millions de tonnes (Anonyme, 2008). Néanmoins, l'Algérie doit importer d'énormes quantités de blé pour satisfaire à la demande nationale. Ainsi, les importations de céréales pour la campagne commerciale 2005/06 (juillet/juin) devaient atteindre environ 6 millions de tonnes. L'Algérie a importé 85% de ses besoins de France pour la campagne 2006/2007, soit 2,6 millions de tonnes de blé tendre et 650 000 tonnes de blé dur. Pour cette saison, qui a connu une baisse vertigineuse due aux insuffisances pluviométriques, les besoins sont estimés à environ 8 millions de tonnes.

8.2. La transformation du blé dans les procédés agroalimentaires

Les principales formes d'utilisation du blé sont la farine pour le blé tendre et la semoule pour le blé dur. Une part du blé produit est réservée à la semence et le reste est destiné à la consommation.

Le procédé de première transformation du blé (Meunerie, semoulerie...) comporte plusieurs étapes. La cargaison de blé sera déchargée au niveau des silos de stockage des unités de transformation. La mise en silo sera effectuée après nettoyage et dépoussiérage des grains. Au cours d'une seconde phase de nettoyage du blé, juste avant la mouture, les métaux, pierres, roches, graines d'autres plantes et pailles sont éliminés. Une fois ces opérations terminées, le blé est humidifié (conditionnement) pour atteindre un taux final d'humidité compris entre 16 et 18%. Le blé est alors prêt pour la transformation, par mouture, en farine ou en semoule.

Le principe de la mouture consiste à passer le blé successivement dans des broyeurs ayant des caractéristiques différentes. Les grains passent entre deux cylindres cannelés tournant en sens inverse et à des vitesses différentes. Plus on descend dans la ligne de broyage, plus les cannelures des cylindres deviennent fines et rapprochées, cette opération permet de séparer l'enveloppe (utilisée pour la fabrication du son) de l'amande (fabrication de la semoule ou de la farine). Des broyeurs à cylindres lisses permettent d'obtenir les produits les plus fins (farines). La séparation et

la purification des produits obtenus sont réalisées par un système de tamis de maillage de plus en plus petit.

II. Les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A

1. Classification des champignons

D'après Hawksworth *et al.*, In « Dictionary of Fungi (1995) », le règne des champignons est divisé en quatre « phylum »: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, et *Basidiomycota*. Les champignons se caractérisent par une croissance sous forme de mycélium et sont hétérotrophes vis à vis des sources de carbone. Les champignons peuvent se classer dans différentes familles. Les chytridiomycètes sont caractérisés par la présence d'un flagelle unique au niveau de la zoospore. Les zygomycètes possèdent un mycélium non septé et sont caractérisés par leur aptitude à fusionner leur mycélium pour former une gamétangie qui donnera des zygospores. Les ascomycètes et les basidiomycètes produisent des spores sexuées, respectivement dans des sacs appelés asques ou à l'extérieur des sacs appelés basides. La germination des ascospores ou des basidiospores donne des filaments cloisonnés. Ils ont également un mode de reproduction asexuée, qui implique la production de conidiospores. Les autres champignons qui ne montrent pas de phase sexuelle sont habituellement classés parmi les deutéromycètes. Ces champignons imparfaits, regroupent les formes dépourvues de reproduction sexuée (reproduction uniquement par voie végétative) et ne sont plus reconnus en tant que division autonome. On place maintenant les formes asexuées dans les divisions auxquelles appartiennent leurs phases sexuées (soit *Ascomycota* ou *Basidiomycota*). La morphologie de la plupart des deutéromycètes ressemble beaucoup plus aux formes anamorphes des ascomycètes. Les données biochimiques ou moléculaires permettent généralement d'attribuer ces champignons imparfaits à l'un ou l'autre de ces groupes. Dans le cas contraire, ils sont conservés provisoirement dans un ensemble artificiel (sans valeur hiérarchique dans la systématique) dénommé « ensemble des champignons mitosporiques » (Bouchet *et al.* 1989).

Bien que la plupart des champignons soient représentés, les ascomycètes et les champignons imparfaits sont les plus largement présents. Leur prédominance est probablement due à leur capacité à produire une large palette d'enzymes lignocellulolytiques, leur conférant un grand pouvoir colonisateur (Gareth-Jones, 1998; Sridhar et Prasannarai, 2001).

2. Isolement et dénombrement des champignons toxigènes

Dans le cadre d'une gestion s'appuyant sur la prévention, il est indispensable d'évaluer le nombre de champignons toxigènes présents dans les produits alimentaires. Les méthodes conventionnelles, basées sur la technique des suspensions-dilutions et ensemencement sur milieu

géosé, sont généralement les plus employées pour l'analyse fongique des produits alimentaires. Après ensemencement et incubation à température optimale (25-30°C) pendant 5 à 10 jours, les colonies sont dénombrées et analysées (ISO 7954, 1987).

Une autre méthode dite « direct plating » est également employée pour la recherche des champignons toxigènes dans les aliments. Celle-ci consiste à ensemencer les particules d'un aliment (graines, noyaux, etc.) directement sur un milieu de culture solide. Les résultats de cette technique d'isolement et de dénombrement sont généralement exprimés en pourcentage de particules infectées. Cette méthode permet beaucoup plus une analyse qualitative que quantitative.

3. Identification des champignons toxigènes

La classification des champignons est historiquement basée sur de nombreux caractères morphologiques et biologiques observables. L'identification des champignons filamenteux est alors effectuée par la comparaison d'un grand nombre de critères d'ordre morphologique, physiologique et écologique (Guarro *et al.* 1999), après leur culture sur différents milieux qui servent alors à induire les phénotypes recherchés.

3.1. Caractères morphologiques

L'observation de l'aspect de la colonie (couleur, texture), des septations, de la forme et du branchement des hyphes, des structures de sporulation et des spores sont une partie des caractères observés pour identifier correctement le champignon. Chaque espèce de champignon est caractérisée non seulement par sa couleur, son apparence et son mode de reproduction, mais aussi par ses exigences spécifiques d'ordre physiologique (ex. température de croissance) et écologique (substrat, conditions d'environnement). La figure 4 montre les structures de quelques moisissures, rencontrées couramment dans les produits alimentaires, sur lesquelles est basée la différenciation des genres fongiques. Cette figure a été reprise du site web de Mycological Research group de St. George Campus, Université de Toronto (Canada):

www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds/IDPlate1.html.

Cependant, ces études morphologiques et physiologiques requièrent un temps considérable de culture après isolement du champignon et une expérience confirmée pour l'identification. En plus, ces critères ne suffisent pas à eux seuls pour identifier d'une manière précise certaines espèces de champignons toxigènes.

Actuellement, l'identification des principaux genres et espèces fongiques repose non seulement sur les caractères morphologiques mais aussi sur les caractères chimiques et moléculaires.

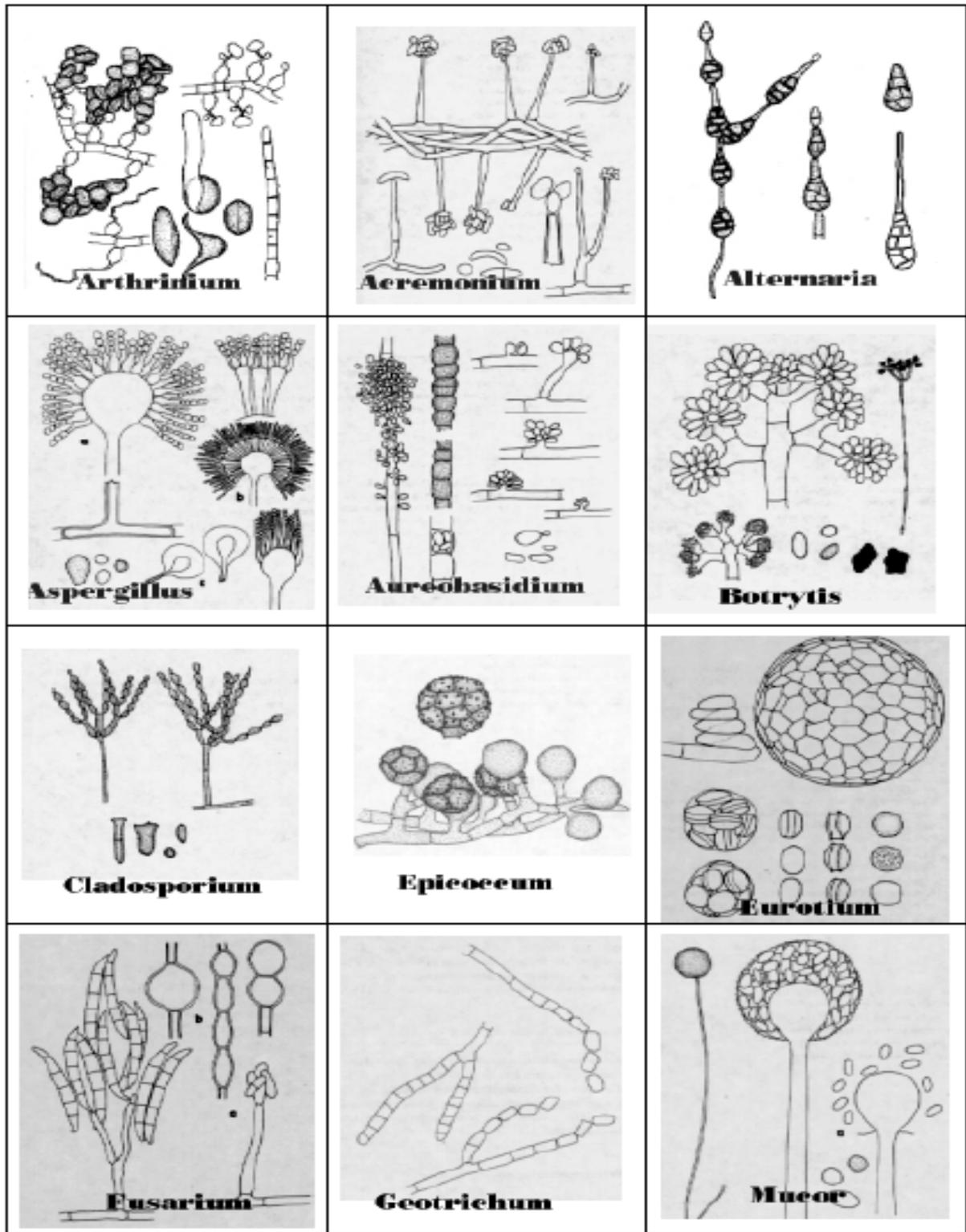


Figure 4. Structures micromorphologiques des moisissures rencontrées couramment dans les produits alimentaires.

Les images ont été reprises à partir de la page web de Mycological Research group de St. George Campus, Université de Toronto (Canada).

www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds/IDPlate1.html

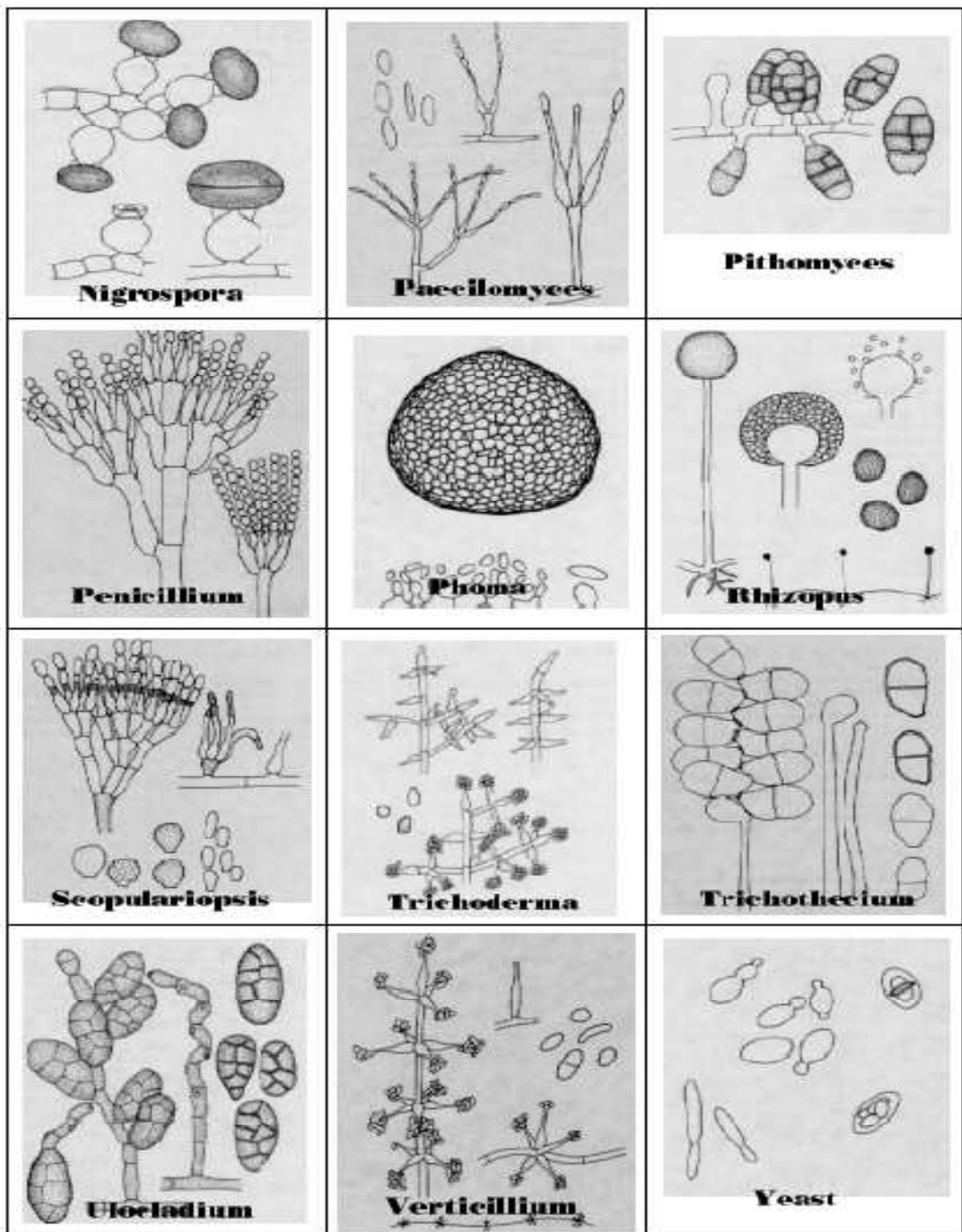


Figure 4 (suite).

3.2. Caractères chimiques

Des méthodes d'analyse biochimiques peuvent également apporter des informations sur le champignon. La détermination du contenu en acide gras, de la composition de la paroi cellulaire, de la composition en protéines ou encore des métabolites secondaires font partie des critères étudiés pour l'identification des champignons toxigènes (Samson *et al.*, 2006).

3.3. Caractères moléculaires

Certaines espèces appartenant au même genre fongique ne peuvent être différenciées que par les outils moléculaires. Ainsi, depuis quelques années des méthodes d'identification basées sur des techniques de biologie moléculaire ont fait leurs preuves et se sont imposées par leur performance. Ces méthodes moléculaires, basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sont aujourd'hui utilisées même pour la quantification de certains champignons mycotoxinogènes (PCR quantitative). Elles ont l'avantage d'être rapides, relativement moins chères et automatisables (Russell et Paterson, 2006). L'amplification par PCR des régions spécifiques de l'ADN est une méthode puissante pour l'analyse ciblée d'un type de champignon (Hsu *et al.*, 2003). Différentes techniques d'identification moléculaire ont été mises au point. Le polymorphisme d'amplification d'ADN aléatoire (Random Amplified Polymorphic DNA ou RAPD) (Hadrys *et al.*, 1992) est une méthode qui consiste à amplifier à l'aide d'amorces dégénérées des cibles aléatoires. Le profil de bandes obtenu peut être caractéristique et permettre la distinction d'espèces de champignons mais aussi de races de la même espèce fongique ((Carnegie *et al.*, 2001). La technique de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (Restriction Length Fragment Polymorphism ou RFLP) (Botstein *et al.*, 1980) et la combinaison PCR et RFLP appelée encore « analyse du polymorphisme de fragments amplifiés » (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences ou CAPS) sont actuellement très utilisées dans l'identification des champignons toxigènes (Kamiya *et al.*, 2004).

Parmi les cibles classiquement utilisées pour l'identification, on retrouve l'ADN ribosomal (ADNr), l'ADN mitochondrial et parfois des séquences répétées de type microsatellites. Actuellement, près de 700 000 séquences d'ADNr fongiques sont disponibles dans la banque de gènes « Genbank ». Pour l'identification des champignons filamenteux, la cible prépondérante est l'ADNr (Guarro *et al.*, 1999) qui présente plusieurs avantages. En effet, il s'agit de séquences répétées dans le génome et retrouvées dans tous les organismes vivants. L'unité minimale se compose de plusieurs parties, des séquences très conservées (18S, 5,8S et 28S) alternant avec des séquences beaucoup plus variables (ETS, ITS1 et 2 et IGS) (Figure 5).

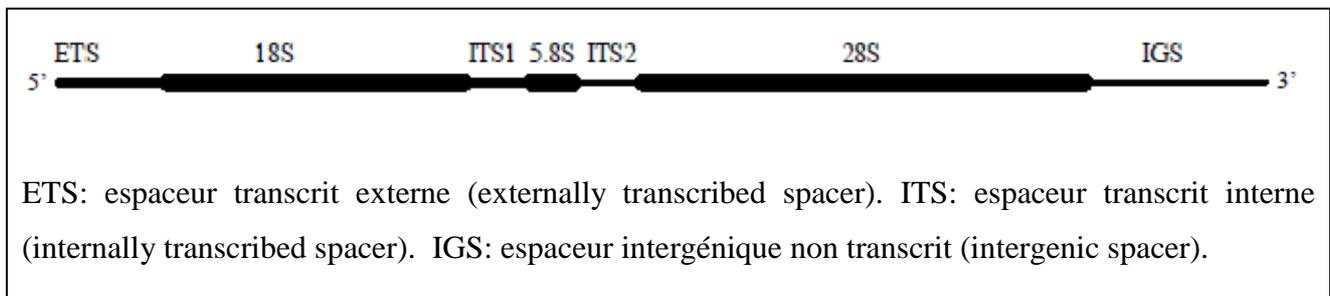


Figure 5. Représentation d'une unité d'ADN ribosomal.

L'une des premières applications de la PCR dans la mycologie a été réalisée par White *et al.*, (1990) concernant l'amplification et le séquençage de l'ADNr fongique pour établir une relation taxonomique et phylogénétique. Les grandes variations génétiques retrouvées dans les parties non codantes des régions ITS et IGS a permis leur utilisation dans les études taxonomique et phylogénétique des champignons filamenteux (Henry *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2001; Mirete *et al.*, 2004; Varga *et al.*, 2004). Actuellement, les portions ITS et IGS sont largement utilisés pour la fabrication des amorces spécifiques permettant la différenciation entre espèces (Pedersen *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2001; Patino *et al.*, 2004 et 2005; Llorens *et al.*, 2006).

Des détails sont donnés sur le genre qui a fait l'objet de nos travaux, à savoir, *Aspergillus*, ainsi que les espèces productrices d'aflatoxines et d'ochratoxine A.

4. Genre *Aspergillus*

4.1. Définition

Les *Aspergillus* spp. sont très répandus dans la nature et tout particulièrement dans le sol où ils contribuent à la biodégradation et le recyclage des matières organiques (Scheidegger et Payne, 2003). Ils sont par ailleurs utilisés dans plusieurs domaines (agriculture, biotechnologie et santé) en exerçant des rôles bénéfiques comme la production de métabolites utiles (enzymes, protéines et acides).

En revanche, les *Aspergillus* sont capables de provoquer des dégâts importants, notamment ceux liés aux contaminations des denrées alimentaires (Pitt *et al.*, 2000). Plusieurs espèces du genre *Aspergillus* sont capables de coloniser de nombreux produits d'origine végétale et de produire des mycotoxines (Scheidegger et Payne, 2003). Parmi les mycotoxines produites par ce genre fongique, seules les aflatoxines, les ochratoxines et la patuline, ont une incidence économique et sanitaire. Ces mycotoxines ont été identifiées la première fois chez *A. flavus*, *A. ochraceus* et *A. clavatus*, respectivement (Smith et Moss, 1985). Cependant, de récentes études ont montré que ces toxines peuvent aussi être produites par plusieurs autres espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Seule une partie de ces champignons mycotoxinogènes peut présenter un risque, car les autres n'en

produisent que de très faibles quantités de toxines ou bien elles sont rarement rencontrées dans l'alimentation (Pitt, 2000).

Etant donné son importance économique extrême liée à ses effets utiles et nuisibles, plusieurs ouvrages ont été consacrés au genre *Aspergillus* en général et à sa taxonomie et sa phylogénie en particulier (Samson et Pitt, 2000; Varga *et al.*, 2003; Frisvad et Samson, 2004; Samson *et al.*, 2006).

4.2. Les caractères morphologiques d'identification du genre *Aspergillus*

Les ouvrages intitulés «The genus *Aspergillus* » de Raper et Fennell (1965) et « Fungi and Food Spoilage » de Pitt et Hocking (1997), constituent une référence pour l'étude des caractères morphologiques des *Aspergillus*. Ces champignons ont une forme caractéristique et des couleurs vives qui les rendent parfois aisément identifiables. L'identification morphologique des espèces appartenant au genre *Aspergillus* est basée sur l'observation des caractères macroscopiques et microscopiques suivants:

- L'aspect de la colonie: la couleur de la partie aérienne est le critère de base qui permet de distinguer les espèces du genre *Aspergillus*. L'autre aspect est la texture de la colonie qui peut être floconneuse, veloutée, etc.

- L'aspect et la couleur du revers de la colonie qui peut parfois être caractéristique d'une espèce.

- La production des sclérotés (amas mycéliens durs), de forme, de taille et de couleur caractéristiques.

- La vitesse de croissance du mycélium.

- La taille, l'ornementation, la couleur et la forme des conidies.

- La forme et la taille des vésicules.

- La présence ou l'absence des stérigmates (métules).

- La longueur des conidiophores et leur aspect.

- La présence de la forme sexuée qui se traduit par la formation des ascospores groupés en huit dans des asques. Ces derniers sont dans une fructification close: le cleistothèce. Celui-ci est généralement entouré par de grosses cellules creuses claires dites « hüll cells », groupées en amas.

4.3. Approche polyphasique de classification des *Aspergillus*

La taxonomie basée sur les études morphologiques traditionnelles permet d'une manière générale de délimiter le taxon. Cependant, il est parfois difficile de différencier entre certaines espèces du genre *Aspergillus* notamment les espèces de la même section. C'est pourquoi la taxonomie de ce genre est actuellement basée sur une approche polyphasique (Frisvad *et al.*, 2004). Ainsi, la caractérisation de certaines espèces nécessite l'étude des caractères micro et macromorphologiques, des conditions de croissance, des caractères moléculaires (séquençage du

gène codant pour la β -tubuline et la région ITS1-5.8S-ITS2 de l'ADNr) et du profil des métabolites produits.

4.4. Description morphologique du genre *Aspergillus*

Les espèces de ce genre présentent un thalle cloisonné portant de nombreux conidiophores longs, érigés vers le haut, non ramifiés, qui se terminent par une tête sphérique appelée vésicule, de forme globuleuse ou claviforme. Les phialides, ou cellules conidiogènes en forme de bouteille, sont formées soit, directement sur la vésicule, on parle alors de tête unisériée, soit sur des cellules spécialisées appelées métules (stérigmates), on parle de tête bisériée (figure 6). Les conidies et les conidiophores sont produites en quantité très abondante. Certaines espèces d'*Aspergillus* ont la capacité de former des amas mycéliens durs, appelés sclérotes, qui aident le champignon à survivre dans des conditions hostiles (Wicklów et Shotwell, 1983). Peu d'espèces du genre *Aspergillus* peuvent se reproduire sexuellement en formant des asques. Les formes sexuées sont rattachées aux genres suivants: *Emericella*, *Eurotium*, *Fennellia*, *Neosartorya*, *Neopetromyces*, *Neocarpenteles*, *Petromyces* et *Scleroacleista*.

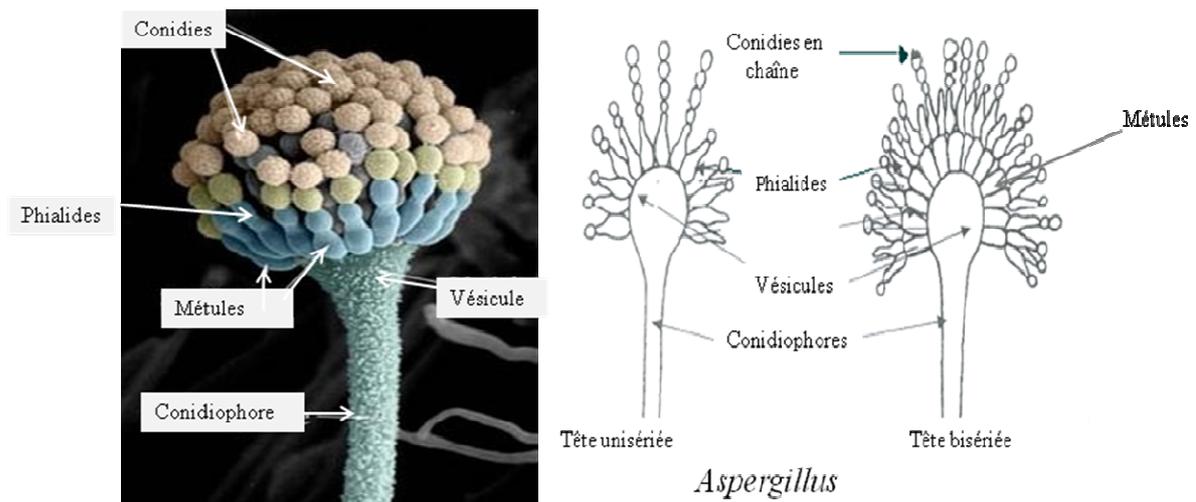


Figure 6. Caractères micromorphologiques du genre *Aspergillus*
www.thegourdreserve.com/mold/into.shtml.

4.5. Systématique des espèces d'*Aspergillus*

Aspergillus est un genre appartenant au phylum *Ascomycota*, Ordre des *Eurotiales*, famille des *Trichocomaceae*. Ce genre comprend des espèces asexuées et sexuées. Les formes sexuées (téléomorphes) sont classées parmi les ascomycètes et les espèces asexuées, parmi les deutéromycètes. L'étude des caractères physiologiques et biochimiques, ainsi que l'analyse des séquences d'ADN, ont permis de classer ces espèces asexuées parmi les formes sexuées correspondantes (Alexopoulos *et al.*, 1996).

La classification du genre *Aspergillus* est actuellement organisée en sous genres et en sections. La taxonomie traditionnelle du genre *Aspergillus*, basée seulement sur les caractères phénotypiques, donne la plupart du temps et de manière satisfaisante, une délimitation des taxons. Cependant, dans plusieurs sections, beaucoup de variations morphologiques peuvent se produire, engendrant parfois des confusions.

Dans l'édition de Raper et Fennell (1965) consacrée au genre *Aspergillus*, 132 espèces subdivisées en 18 groupes ont été décrites. Cette classification, basée surtout sur les caractères cultureux et morphologiques, est encore valable et utilisée par de nombreux mycologues. Ces groupes ont été appelés « Sections » par Gams *et al.* (1985). Complétant les descriptions morphologiques (essentielles), l'analyse phylogénique des séquences de l'ADNr entreprise par Peterson *et al.* (2000) a conduit à une classification aboutissant à un total de 15 sections (*Aspergillus*, *Restricti*, *Cervini*, *Terrei*, *Flavipedes*, *Nigri*, *Circumdati*, *Flavi*, *Cremeri*, *Candidi*, *Wentii*, *Fumigati*, *Clavati*, *Nidulantes*, *Versicolores*, *Usti*, *Sparsi*, *Ornati* et « *Warcupiella* group »). Cette classification est la plus admise par la plupart des mycologues.

Une analyse phylogénique des sections incluant les espèces productrices de mycotoxines (*Circumdati*, *Flavi*, *Nigri*, *Fumigati* et *Clavati*) a été effectuée par comparaison des séquences nucléotidiques du gène codant pour la protéine β -tubuline et pour l'ADNr. Les résultats ont montré que des espèces phylogéniquement éloignées peuvent produire les mêmes mycotoxines (Varga *et al.* 2003, Samson *et al.*, 2006). En effet, dans les conditions de laboratoire, les aflatoxines, l'OTA et la patuline sont produites par des espèces appartenant à des sections différentes. Sur la base de ces observations, il est permis de penser que le pouvoir producteur de mycotoxines serait perdu ou acquis plusieurs fois au cours de l'évolution.

De nombreux travaux réalisés sur le métabolisme secondaire des champignons ont montré que les gènes impliqués dans la biosynthèse de plusieurs mycotoxines sont en général organisés en *cluster* (groupement des gènes exprimés de façon similaire). Ces gènes peuvent être transférés horizontalement à d'autres espèces éloignées permettant ainsi la synthèse de ces mycotoxines chez des espèces phylogéniquement éloignées. Un tel mécanisme peut d'ailleurs expliquer la production très répandue de l'OTA et de la patuline chez plusieurs espèces du genre *Aspergillus* (Samson *et al.*, 2006).

Nous donnerons ci-après une synthèse bibliographique sur les trois sections du genre *Aspergillus* (*Flavi*, *Circumdati* et *Nigri*) productrices des aflatoxines et de l'OTA et qui ont fait l'objet de notre travail.

5. *Aspergillus* section *Flavi*

Les membres d'*Aspergillus* section *Flavi* (groupe d'*A. flavus*) occupent des niches écologiques très diverses. Les espèces de cette section peuvent être présentes dans la nature soit comme des saprophytes dans le sol ou comme des parasites des plantes, des insectes et des animaux (Horn et Dorner, 1998). Dans cette section, *A. flavus* et *A. parasiticus* retiennent le plus d'attention car elles sont non seulement pathogènes pour certaines plantes (arachides, maïs et coton), mais elles produisent les aflatoxines (Smith et Moss 1985). De plus, ce sont les espèces les plus fréquentes.

5.1. Description morphologique de la section *Flavi*

Les espèces non productrices d'aflatoxines telles que *A. oryzae*, *A. sojae* et *A. tamaritii* sont utilisées dans les processus de fermentation (Geiser *et al.*, 1998).

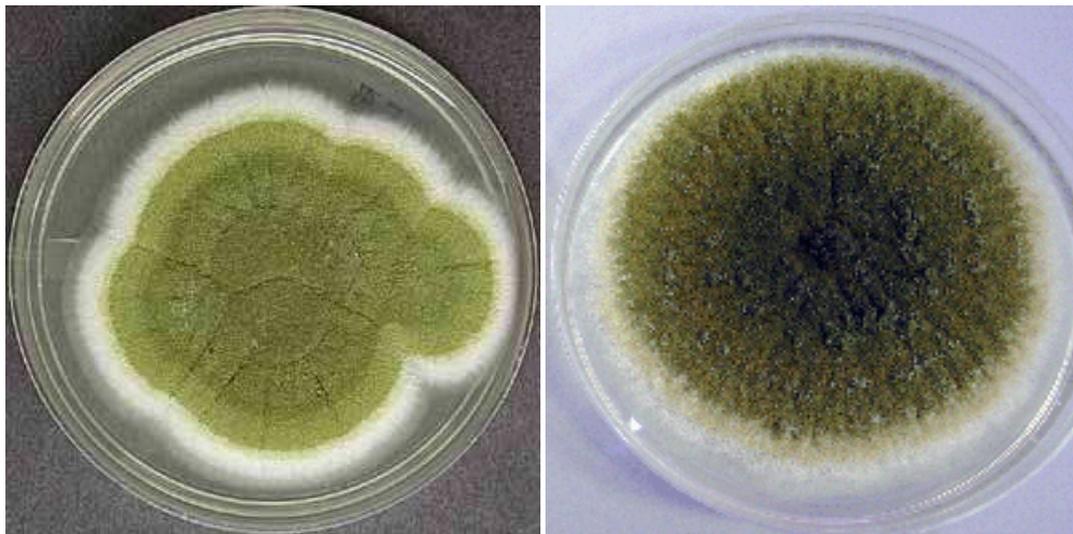
Morphologiquement, *Aspergillus* section *Flavi* comprend les espèces avec des têtes conidiennes de couleur jaune-vert à brun dont certaines produisent des sclérotés brun foncé ou parfois jaunes (Figure 7). En se basant principalement sur la couleur des têtes conidiennes et l'ornementation des conidies, Raper et Fennell (1965) ont décrit dans le groupe d'*Aspergillus flavus* neuf espèces et deux variétés.

5.2. Les espèces de la section *Flavi* et leurs mycotoxines

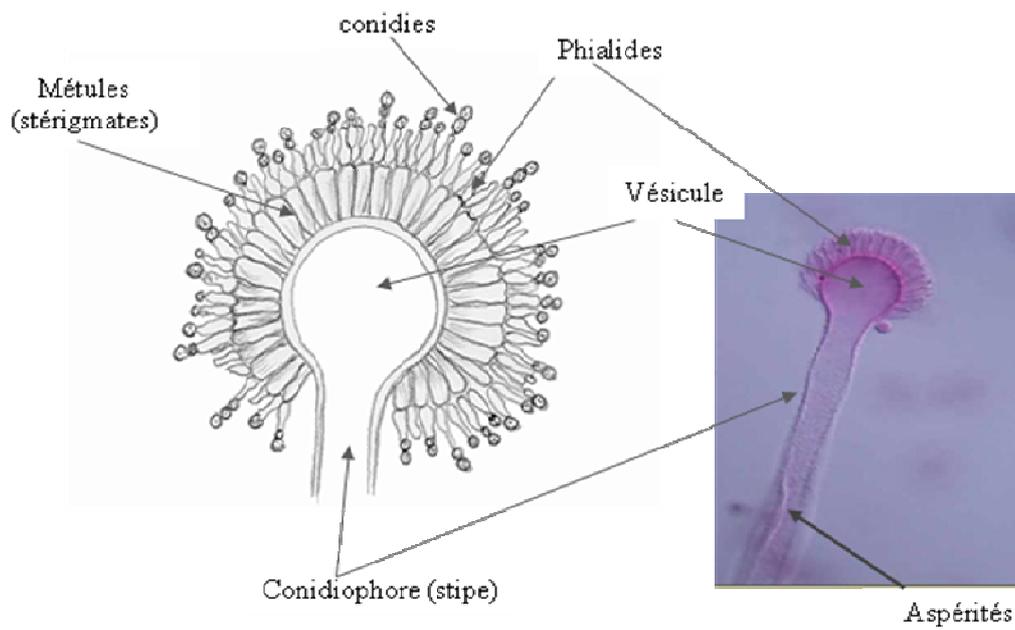
Dans la clé synoptique publiée en 1981 par Christensen, 14 espèces et 4 variétés ont été décrites. Cette clé est basée sur l'étude des caractères cultureux et morphologiques, dont la couleur des têtes conidiennes, la croissance à 37°C et les dimensions des conidiophores, des vésicules et des conidies (Christensen, 1981). De très nombreuses études ont été menées sur ce groupe (Samson et Pitt, 2000). D'après Samson *et al.* (2006), il y a 18 espèces appartenant à la section *Flavi* (Tableau 10).

Ces espèces développent des couleurs allant du jaune-vert à brun. Seules trois espèces, *Petromyces alliaceus*, *P. albertensis* et *A. lanosus*, ont une morphologie semblable au groupe d'*A. ochraceus* avec des conidies jaunes à ocre. Ces 3 espèces étaient classées auparavant dans la section *Circumdati* (groupe d'*A. ochraceus*) mais les données de la biologie moléculaire ont permis leur reclassement dans la section *Flavi*.

Les critères d'identification des espèces de la section *Flavi* sont actuellement basés sur la morphologie, le profil des mycotoxines produites et l'analyse des séquences de l'ADNr (Ito *et al.*, 2001; Varga *et al.* 2003 ; Samson *et al.*, 2006). L'analyse des séquences ITS des isolats a montré qu'*Aspergillus* section *Flavi* forme 3 clades (*A. alliaceus*, *A. flavus* et *A. tamaritii*) qui peuvent être distingués par la couleur des colonies et leur composition en ubiquinones (Rigó *et al.*, 2002; Samson *et al.*, 2006). *Aspergillus flavus* est une espèce génétiquement très complexe et a été



A: aspect macroscopique d'*Aspergillus flavus* sur milieu CYA.



B: aspect microscopique d'*Aspergillus flavus*

Figure 7. Aspects macroscopique et microscopique d'*Aspergillus flavus*.
<http://www.moldbacteria.com>

Tableau 10. Espèces d'*Aspergillus* de la section *Flavi* et leurs métabolites (Frisvad *et al.*, 2004).

Espèce	Acide kojique	Aflatoxines B	Aflatoxines G	Acide cyclopiazonique	Acide apergillique	Ochratoxine A
<i>Aspergillus arachidicola</i>	+	+	+	-	+	-
<i>Aspergillus avenaceus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus bombycis</i>	+	+	+	-	+/-	-
<i>Aspergillus caelatus</i>	+	-	-	+	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	+	+/-	-	+	+	-
<i>Aspergillus lanosus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus leporis</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus minisclerotium</i>	+	+	+	+	+	-
<i>Aspergillus nomius</i>	+	+	+	-	+	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	+	-	-	+	-	-
<i>Aspergillus parasiticus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>Aspergillus parvisclerotigenus</i>	+	+	+/-	+	+	-
<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	+	+	-	+	-	-
<i>Aspergillus sojae</i>	+	-	-	-	+	-
<i>Aspergillus tamarii</i>	+	-	-	+/-	-	-
<i>Aspergillus toxicarius</i>	+	+	+	-	+	-
<i>Petromyces albertensis</i> ^a	+	-	-	-	-	+
<i>Petromyces alliaceus</i> ^b	+	-	-	-	-	+

^a Forme sexuée d'*Aspergillus albertensis*. ^b Forme sexuée d'*Aspergillus alliaceus*.

+ : producteur. - : non producteur. +/- : production variable suivant les souches.

subdivisée en deux catégories, selon les caractères morphologique et génétique, et le profil de production des mycotoxines.

Morphologiquement, on peut distinguer deux catégories d'isolats. La première catégorie produit des sclérotés grands, de type « L » (Large) de diamètre supérieur à 400 µm. La seconde catégorie produit de nombreux petits sclérotés, de type « S » (Small), de diamètre inférieur à 400 µm (Cotty, 1989). Selon Geiser *et al.* (1998, 2000) et Vaamonde *et al.* (2003), *A. flavus* est divisé en deux groupes non distincts morphologiquement. Le groupe I comprend les types « L » et « S » producteur d'aflatoxine B et le groupe II comprend uniquement le type « S » capable de produire les aflatoxines B et G. Ces auteurs ont suggéré que les isolats de type « S » (groupe II) méritent d'être considérés comme une nouvelle espèce (Geiser *et al.*, 2000). D'après Hua Sui-Sheng (2002), tous les isolats de type « S » sont aflatoxinogènes, alors que le type « L » comprend des producteurs et des non producteurs.

L'acide cyclopiazonique (CPA) est une toxine produite par certaines souches d'*A. flavus* et par *Penicillium* spp., notamment *P. aurantiogriseum* (anciennement *P. cyclopium*), dont le CPA a été isolé pour la première fois. Le CPA est un indole acide tetramique (Figure 8) et est toxique pour l'Homme et l'animal. En effet, il provoque des lésions du foie, des reins, du pancréas et du cœur (Purchase, 1971). Les aflatoxines et le CPA peuvent être retrouvés dans les mêmes produits alimentaires. Ces deux mycotoxines ont d'ailleurs été isolés dans les tourteaux d'arachides ayant provoqué la « maladie X du dindon » (Dorner *et al.* 1983; Horn et Dorner 1999).

La production d'aflatoxines durant le métabolisme secondaire est sans doute le caractère le plus important pour *Aspergillus* section *Flavi*. *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, et *A. nomius* (Kurtzman *et al.*, 1987) sont les espèces productrices d'aflatoxines les plus communes. *Aspergillus flavus* produit généralement les aflatoxines de type B1 et B2 et l'acide cyclopiazonique (CPA), mais la production de ces toxines est extrêmement variable (Horn et Dorner, 2002). Certaines isolats de type « S » peuvent produire également (en plus de B1 et B2) les aflatoxines G1 et G2 (Geiser *et al.*, 2000; Cordwell et Cotty, 2002). Par contre, *A. parasiticus* et *A. nomius* produisent les quatre types d'aflatoxines (B1, B2, G1 et G2) mais pas le CPA comme le montre le tableau 11 (Dorner *et al.*, 1984; Horn *et al.*, 1996 ; Varga *et al.*, 2003). Généralement, *A. parasiticus* est fortement productrice d'aflatoxines, et des isolats non producteurs sont rares chez cette espèce (Horn *et al.*, 1996; Tran-Dinh *et al.*, 1999). Récemment la production d'aflatoxines par *A. pseudotamarii* a été rapportée (Goto *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2006). Actuellement, la liste des espèces aflatoxinogènes de la section *Flavi* comprend: *A. arachidicola*, *A. bombycis*, *A. flavus*, *A. minisclerotium*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii* et *A. toxicarius*. Les autres espèces productrices d'aflatoxine B1 classée à l'extérieur de la section *Flavi* sont: *A.*

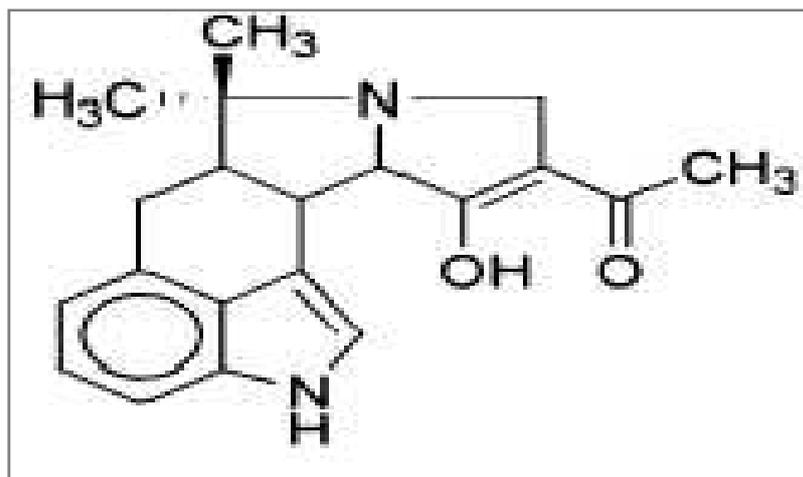


Figure 8. Structure chimique de l'acide cyclopiazonique (CPA).

Tableau 11. Production d'aflatoxines B et G, d'acide cyclopiazonique et d'acide kojique par les principales espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* (Varga *et al.*, 2003).

Espèce	Aflatoxines		Acide cyclopiazonique	Acide kojique
	B	G		
<i>A. flavus</i> groupe I	+	-	±	+
<i>A. flavus</i> groupe II	+	±	+	+
<i>A. oryzae</i>	-	-	±	+
<i>A. parasiticus</i>	+	+	-	+
<i>A. sojae</i>	-	-	-	+
<i>A. nomius</i>	+	+	-	+
<i>A. bombycis</i>	+	+	-	+
<i>A. tamarii</i>	-	-	+	+
<i>A. caelatus</i>	-	-	-	+
<i>A. pseudotamarii</i>	+	-	+	+

+ : producteur. - : non producteur. ± : production variable selon les souches.

ochraceoroseus, *A. rambelli* (*Aspergillus* section *Ochraceorosei*), *Emericella astellata* et *E. venezuelensis* (*Aspergillus* section *Nidulantes*) (Frisvad *et al.*, 2005).

La stérigmatocystine, toxine intermédiaire dans la voie de biosynthèse de l'aflatoxine, est synthétisée comme métabolite par plusieurs espèces d'*Aspergillus* de sections différentes et même par d'autres genres fongiques (Barnes *et al.*, 1994). Il est donc vraisemblable que l'aflatoxine peut être produite par d'autres espèces d'*Aspergillus*. *A. nomius*, morphologiquement très proche d'*A. flavus*, produit les aflatoxines B et G et est fréquente dans le sol et parasite les insectes (Kurtzman *et al.*, 1987; Peterson *et al.*, 2001). *A. pseudotamarii* a été isolée au Japon, au Brésil (Ito *et al.*, 2001), dans les sols des forêts d'Afrique (Klich *et al.*, 2000) et tout récemment dans les sols de Thaïlande (Ehrlich *et al.*, 2007). A la différence d'*A. flavus* et d'*A. parasiticus*, les autres espèces aflatoxinogènes n'ont pas d'impact majeur en agroalimentaire.

6. *Aspergillus* Section *Circumdati*

Historiquement, *Aspergillus* section *Circumdati* (groupe d'*Aspergillus ochraceus*) inclue les espèces à têtes conidiennes bisériées à couleur jaune à ocre. Ce groupe est particulièrement bien connu pour sa production de l'ochratoxine A (Van der Merwe *et al.* 1965). Les espèces d'*Aspergillus* section *Circumdati* possèdent des conidies de couleur jaunes à ocres et des sclérotés de couleur brun clair à brun foncé, et produisent au moins un des métabolites suivants: ochratoxines, acide pénicillique, xanthomegnines ou malléine (Samson *et al.*, 2006). L'espèce type de la section *Circumdati* est *Aspergillus ochraceus*.

6.1. Description morphologique de l'espèce *A. ochraceus*

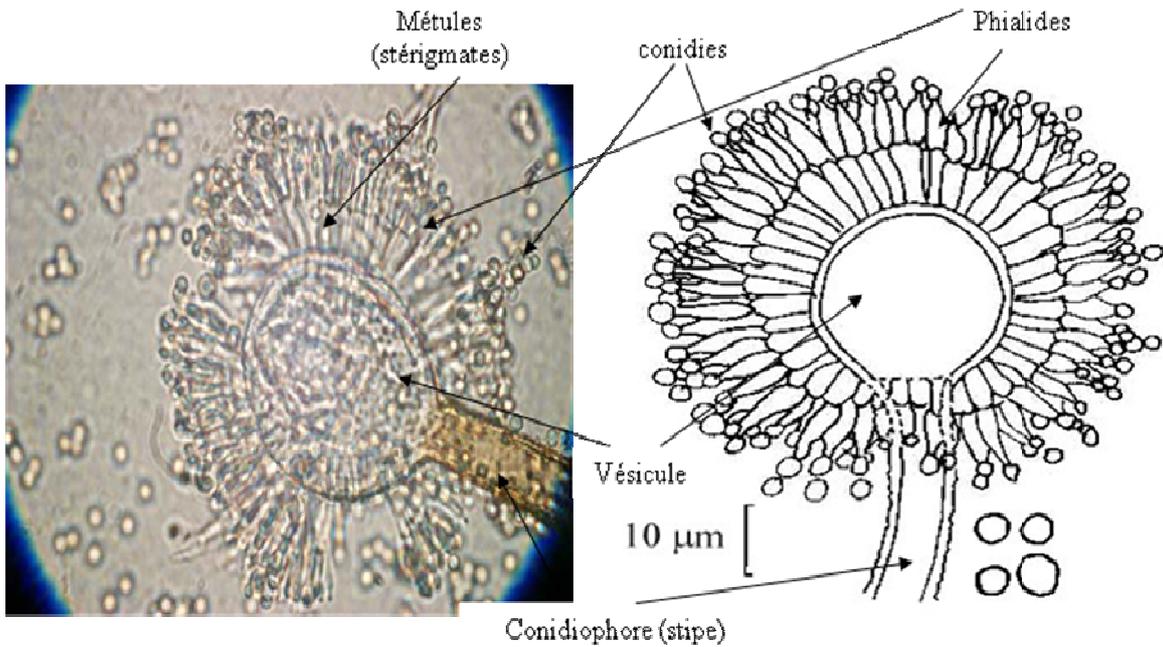
Sur milieu Malt Extract Agar (MEA), la colonie est de texture granuleuse et de couleur ocre à chamois claire. Le revers est brun clair (Cahagnier *et al.*, 1998). Sur milieu Czapek Yeast extract Agar (CYA), le diamètre de la colonie est de 40 à 52 mm après 7 jours d'incubation à 25°C. Le stipe est rugueux et pigmenté, de 400 à 1000 µm de long. Les vésicules sont sphériques à légèrement allongées portant des métules (bisériée), de diamètre de 20 à 35 µm. Les conidies sont globuleuses, lisses ou faiblement échinulées de 2,5 à 3,5 µm de diamètre (Figure 9) (Pitt et Hocking, 1997; Cahagnier, 1998). Les espèces de cette section sont rencontrées surtout dans le café, mais aussi dans le riz (Miyaki *et al.*, 1969; Uchiyama *et al.*, 1976), le blé et le maïs à des teneurs relativement faibles (Wallace et Sinha, 1962).

6.2. Les espèces de la section *Circumdati*

Sur la base de la production de métabolites et le séquençage partiel du gène codant pour la β -tubuline, 19 espèces ont été distinguées (Samson *et al.*, 2006). Ces espèces ne sont pas



a: aspect macroscopique du mycélium ocre produisant des sclérotés (point bruns). b: conidiophores et têtes conidiennes (GX70).



c: aspect microscopique de la tête conidienne (Gx650).

d: structure détaillée de la tête conidienne.

Figure 9. Aspects macroscopique et microscopique d'*Aspergillus ochraceus* (www.univ-brest.fr/.../Myco/fiches/aspeochra.html).

différenciables par les caractères macro et micromorphologiques. Les espèces de la section *Circumdati* et leurs différents métabolites sont présentés dans le tableau 12. Parmi les 19 espèces, 11 produisent la melléine, 17, l'acide pénicillique et 17, les xanthomégnes. Sept espèces produisent d'une manière constante de grandes quantités d'OTA: *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. sulphureus*, *A. westerdijkiae* et *Neopetromyces muricatus* (anamorphe = *Aspergillus muricatus*). Les espèces *A. ochraceus* et *A. sclerotiorum* produisent inconstamment des quantités plus ou moins faibles d'OTA. Par ailleurs, 4 espèces, *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. petrakii* et *A. persii*, ont été signalées dans la bibliographie comme productrices d'une manière irrégulière de faibles quantités d'OTA. Il faut signaler que *Petromyces alliaceus* (anamorphe = *Aspergillus alliaceus*) et *Petromyces albertensis* (anamorphe = *A. albertensis*), deux espèces fortement ochratoxinogènes, sont actuellement classées dans la section *Flavi*.

Les espèces les plus importantes concernant la production potentielle de l'OTA dans les denrées alimentaires sont: *A. ochraceus*, *A. steynii*, *A. westerdijkiae* pour la section *Circumdati* et *A. alliaceus* (*Petromyces alliaceus*) dans la section *Flavi* (Frisvad *et al.*, 2004; Suárez-Quiroz, *et al.*, 2004) et quelques espèces de la section *Nigri*.

7. *Aspergillus* section *Nigri*

Parmi les champignons filamenteux, *Aspergillus* section *Nigri* est un groupe qui joue un rôle très important en bioindustrie (Campbell-Platt et Cook, 1989). Plusieurs souches de cette section sont utilisées dans l'industrie des fermentations pour la production d'acides et d'enzymes d'hydrolyse. *A. awamori* et *A. niger* sont utilisées pour la production d'enzymes extracellulaires (amylases et lipases) et d'acides organiques (acide citrique et gluconique), utilisés comme additifs alimentaires.

Cependant, la production de l'OTA par les aspergilli noirs dont *A. niger* et *A. carbonarius* n'est pas sans importance, car ce groupe de champignons est très répandu dans les aliments. En effet, parmi les champignons rencontrés dans les denrées alimentaires, *A. niger* est le plus répandu dans les climats chauds, que ce soit au champ ou durant le stockage. *A. niger* est isolé couramment des arachides, noix de pécan, pistaches, noisettes, noix, noix de coco et coprah. Cette espèce est également rencontrée dans les céréales et les graines oléagineuses notamment le maïs, le blé, le riz stocké et échaudé, l'orge, le soja, le sorgho et les haricots secs (Pitt et Hocking, 1997).

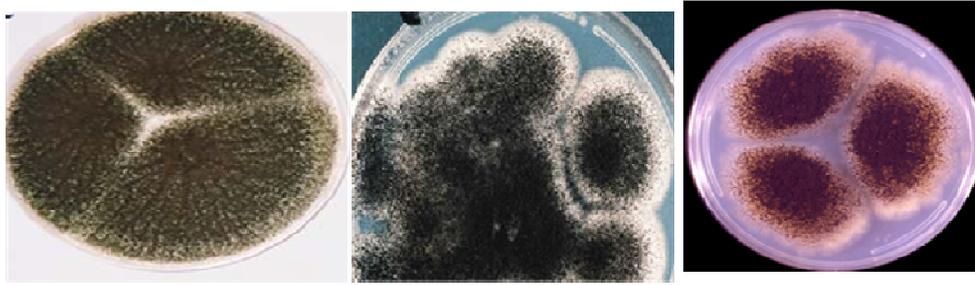
7.1. Description morphologique de la section *Nigri*

Les *Aspergillus* noirs, définis « groupe d'*A. niger* », présentent des colonies foncées, souvent noires, et des conidiophores unisériés ou bisériés (Figure 10). Ils ont été isolés dans une grande

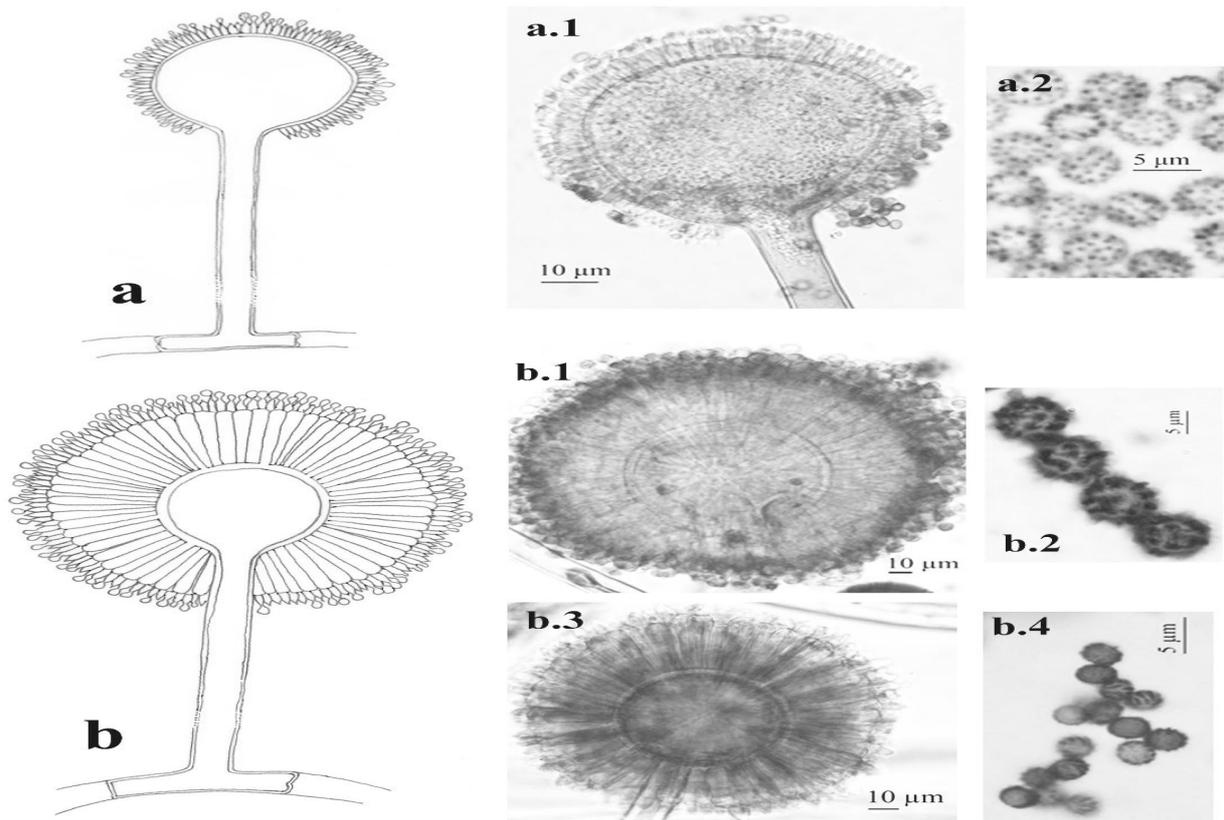
Tableau 12. Espèces d'*Aspergillus* section *Circumdati* et leurs métabolites (Frisvad *et al.*, 2004).

Espèce	Ochratoxine A	Acide pénicillique	Xanthomégnes	Melléine
<i>Aspergillus auricomus</i>	–	+	+	+
<i>Aspergillus bridgeri</i>	–	+	+	–
<i>Aspergillus cretensis</i>	+	+	–	+
<i>Aspergillus elegans</i>	–	–	+	–
<i>Aspergillus flocculosus</i>	+	+	+	+
<i>Aspergillus insulicola</i>	–	+	+	+
<i>Aspergillus melleus</i>	–	+	+	+
<i>Aspergillus neobridgeri</i>	–	+	+	–
<i>Aspergillus ochraceus</i>	+/-	+	+	+
<i>Aspergillus ostianus</i>	–	+	+	+
<i>Aspergillus persii</i>	–	+	+	–
<i>Aspergillus petrakii</i>	–	+	+	+
<i>Aspergillus pseudoelegans</i>	+	+	–	+
<i>Aspergillus roseoglobulosus</i>	+	+	+	–
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	+/-	+	+	–
<i>Aspergillus steynii</i>	+	–	+	+
<i>Aspergillus sulphureus</i>	+	+	+	–
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	+	+	+	+
<i>Aspergillus muricatus</i>	+	+	+	–

+ : producteur. – : non producteur. +/- : production variable suivant les souches.



A: aspect macroscopique d'*Aspergillus* section *Nigri* sur milieu CYA.



a: tête unisériée. tête conidienne (a.1) et conidies (a.2) d'*A. japonicus* var. *aculeatus* A-969, UAB Mycology group.

b: tête bisériée. *A. carbonarius* A-1157, UAB Mycology group, tête conidienne (b.1) et conidies (b.2); *Aspergillus niger* aggregate A-219, UAB Mycology group, tête conidienne (b.3) et conidies (b.4).

Figure 10. Aspects macroscopique et microscopique d'*Aspergillus* section *Nigri* (Abarca *et al.*, 2004).

variété de produits de par le monde et sont considérés comme des champignons ubiquitaires responsables de la dégradation des aliments et de la biodégradation d'autres matériaux.

7.2. Les espèces de la section *Nigri* et leurs pouvoir producteur d'ochratoxine A

Raper et Fennell (1965) a retenu 12 espèces dans ce groupe. Depuis, de nombreuses études se sont enchainées sur la taxonomie de ce groupe et plusieurs changements ont été apportées sur la taxonomie des espèces. Les dernières études datent de l'année 2004 et 2006 (Abarca *et al.*, 2004; Samson *et al.*, 2004 ; Samson *et al.*, 2006). Abarca *et al.* (2004), a distingué la section *Nigri* en deux grands groupes:

- Le groupe formant les espèces unisériées

Il est représenté par *Aspergillus japonicus* et *A. aculeatus*. Raper et Fennell (1965) ont considéré ces 2 taxons comme 2 espèces distinctes. Cependant, Al-Musallam (1980) a considéré *A. aculeatus* Iizuka comme une variété d'*A. japonicus* et l'a nommé *A. japonicus* var. *aculeatus*. Cette dernière se distingue d'*A. japonicus* var. *japonicus* Saito par ses vésicules larges (> 45 µm de diamètre) avec une prédominance de conidies ellipsoïdales. Néanmoins, *A. japonicus* var. *japonicus* peut parfois avoir des conidies ellipsoïdales. Pitt et Hocking (1997) considèrent qu'*A. japonicus* et *A. aculeatus* présentent des différences assez importantes du point de vue morphologique et production de métabolites pour ne pas les considérer comme deux espèces différentes. Les études basées sur la RFLP ont pu montrer des différences entre les 2 taxons (Pařenicová *et al.*, 2000). Cependant le séquençage de la région ITS1-5,8S -ITS2 de l'ADNr n'a pas abouti à différencier *A. japonicus* de *A. aculeatus*; il a juste permis de séparer les unisériées des bisériées (2 clades distincts).

- Le groupe formant les espèces bisériées

Il renferme *A. carbonarius* et *A. niger* « aggregate ». *A. carbonarius* peut facilement être distinguée des autres espèces par la taille de ses conidies qui est supérieure à 6 µm de diamètre. *A. niger* « aggregate » forme un groupe d'espèces extrêmement difficile à différencier morphologiquement. De nombreux travaux sur les caractères morphologique, biochimique et moléculaire ont tenté de distinguer entre les espèces de ce groupe.

Sur la base de l'étude des caractères phénotypiques, la production de métabolites et le séquençage du gène de la β-tubuline, 15 espèces sont actuellement acceptées provisoirement dans la section *Nigri* (Samson *et al.*, 2006):

- Deux espèces unisériées: *A. japonicus* et *A. aculeatus*
- Treize espèces bisériées dont *A. carbonarius* et 12 espèces d'*A. niger* « aggregate » : *A. brasiliensis*, *A. costaricaensis*, *A. ellipticus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *A. piperis*, *A. sclerotioniger*, *A. turingensis* et *A. vadensis*. Parmi les 15

espèces de la section *Nigri*, quatre sont ochratoxinogènes: *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. lacticoffeatus* et *A. sclerotium*.

III. Les aflatoxines

1. Origine et propriétés physico-chimiques

Les études conduites sur la matière première qui avait été à l'origine de la « maladie X du dindon » en Angleterre, aboutirent à l'isolement de la moisissure responsable, *Aspergillus flavus*, et à la caractérisation des aflatoxines (Sargeant *et al.*, 1961). A l'état actuel on connaît, du point de vue structure, au moins 16 aflatoxines (Cole et Cox, 1981) dont les principales sont l'AFB1, l'AFB2, l'AFG1, l'AFG2 et l'AFM1 (Figure 11). Elles sont produites principalement par les espèces du genre *Aspergillus* dont, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* et *A. pseudotamarii*. Les quatre principales aflatoxines détectées dans les produits végétaux contaminés sont l'AFB1, l'AFB2, l'AFG1 et l'AFG2. L'AFB1 est partiellement métabolisée en un dérivé hydroxylé, communément appelé "Milk Aflatoxin 1" ou aflatoxine M1 (AFM1), lors de l'ingestion de produits contaminés. Les aflatoxines posent un risque pour la santé humaine et animale (Park et Liang, 1993). Le Centre international de la recherche sur le cancer a classé l'aflatoxine B1 dans le groupe 1 (cancérogène humain) et l'AFM1 dans le groupe 2B (cancérogène humain probable) (C.I.R.C , 1993).

Les aflatoxines sont caractérisées au niveau moléculaire par des structures de coumarines bifuraniques auxquelles sont accolées des pentanones (Aflatoxine B) ou des lactones hexatomiques (Aflatoxine G). Toutes les aflatoxines se rattachent à l'un de ces deux types de structure et ne diffèrent entre elles que par la position de divers radicaux sur les noyaux. Les aflatoxines sont des molécules de faible poids moléculaire (312 à 330 g/mol), très peu solubles dans l'eau (10-20 mg/litre), insolubles dans les solvants non polaires et très solubles dans les solvants organiques moyennement polaires à polaires (chloroforme et méthanol). La fluorescence intense des aflatoxines, une fois exposées à des longueurs d'ondes ($\lambda = 365$ nm) de la lumière ultra-violette (U.V.), a pour avantage de détecter ces composés à des niveaux extrêmement bas (de l'ordre du nanogramme). L'aflatoxine de type B (AFB = AF « blue ») donne une fluorescence bleue et l'aflatoxine de type G (AFG = AF « Green »), donne une fluorescence verte. L'AFM1 donne une fluorescence bleu-mauve. Cette fluorescence fournit la base pour pratiquement toutes les méthodes physico-chimiques de leur détection et leur quantification. Les propriétés physico-chimiques des principales aflatoxines sont résumées dans le tableau 13.

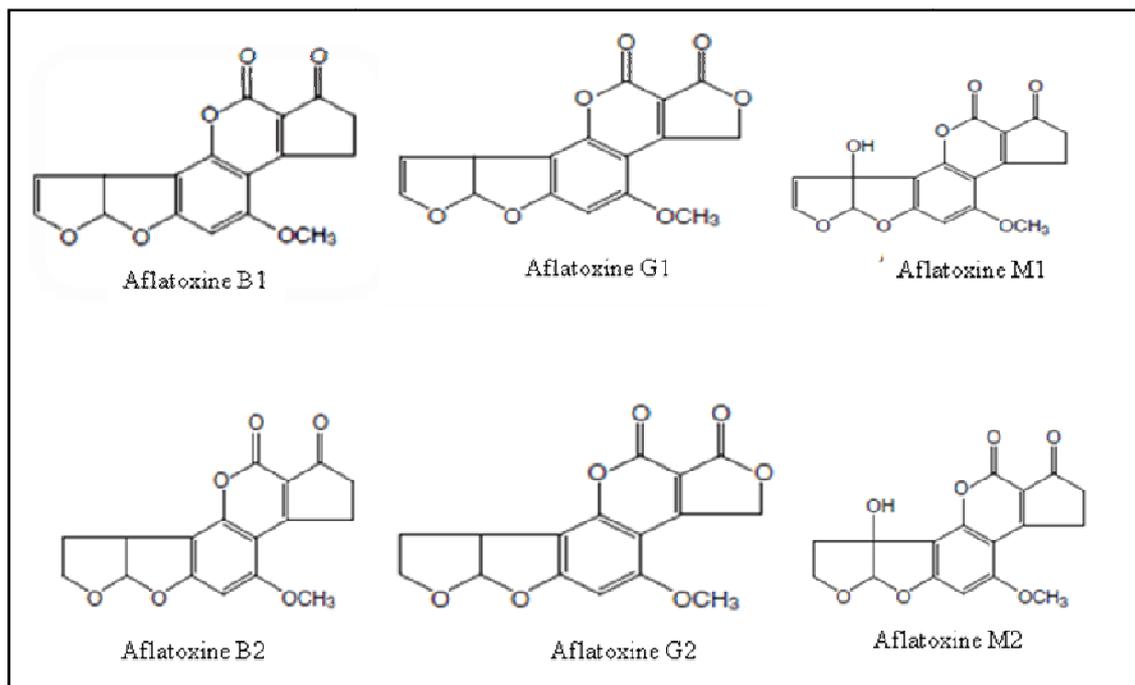


Figure 11. Structures chimiques des aflatoxines B1, B2, G1, G2, M1 et M2 (Dutton *et al.*, 1985).

Tableau 13. Propriétés physico-chimiques des principales aflatoxines (Dutton *et al.*, 1985).

Aflatoxine	Formule brute	Masse molaire	Point de fusion	Absorption maximale à la lumière UV dans le méthanol	
				Coefficient d'extinction molaire à 265 nm	Coefficient d'extinction molaire à 360– 362 nm
B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312,3	268– 269	12 400	21 800
B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314,3	286– 289	12 100	24 000
G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3	244– 246	9 600	17 700
G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,3	237– 240	8 200	17 100
M1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328, 3	299	14 150	21 250 (357 nm)
M2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	12 100 (264 nm)	22 900 (357 nm)
Aflatoxicol	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	230– 234	10 800 (261 nm)	14 100 (325 nm)

2. Contamination en aflatoxines des denrées alimentaires

La présence des aflatoxines dans l'alimentation humaine et animale est le résultat d'une contamination par des espèces fongiques aflatoxinogènes. Le taux et le degré de contamination dépendent étroitement de la température, de l'humidité et des conditions de stockage. Les aflatoxines sont couramment rencontrées sur les cultures dans les champs avant la récolte dans les pays chauds et humides. La contamination après la récolte et/ou pendant le stockage est également possible, si le séchage des cultures est retardé. Elles contaminent surtout les arachides, les pistaches, les amandes, mais aussi les graines de coton et de tournesol, ainsi que certaines céréales (maïs, blé, sorgho) et leurs produits dérivés. Les aflatoxines peuvent également être retrouvées dans les épices (piment rouge, poivre), les fruits secs et le tabac (Vargas *et al.*, 2001).

L'aflatoxine M1, dérivé de L'AFB1, peut être retrouvée dans le lait et ses dérivés issus d'animaux consommant des aliments contaminés par l'AFB1. L'accumulation des aflatoxines dans les viandes et les produits de charcuteries semble être peu probable (Pfohl-Leszkowicz, 1999b).

3. Facteurs influençant la teneur en aflatoxines dans les denrées alimentaires

Aspergillus flavus peut produire les aflatoxines B1 et B2, alors que *A. parasiticus* et *A. nomius* produisent les 4 aflatoxines (B1, B2, G1 et G2). *A. flavus* est le principal agent de contamination du maïs et des graines de coton, tandis qu'*A. parasiticus* est présent surtout dans les graines d'arachide. Les conditions les plus favorables pour le développement d'*A. flavus* et la production d'aflatoxines sont:

- une activité de l'eau supérieure à 0,83;
- une température comprise entre 25 et 40 °C;
- la présence d'oxygène;
- le développement du champignon sur des plantes stressées;
- la présence d'insectes et de graines abîmées;
- le stockage en milieu chaud et humide;
- le développement du champignon dans les tunnels de séchage des pâtes alimentaires.

La prolifération fongique et la production d'aflatoxines peuvent avoir lieu au champ et au cours du stockage. Au champ, les insectes attaquent la surface des grains facilitant ainsi l'accès de la moisissure aux structures internes qui contiennent les nutriments. Un tel scénario ne concerne pas seulement les zones tropicales et les cultures d'arachide mais aussi les zones tempérées lors de saisons exceptionnellement chaudes mais de plus en plus fréquentes pour certaines cultures comme le coton ou le maïs et les ensilages de maïs. Les aflatoxines sont peu sensibles aux traitements thermiques (stérilisation, pasteurisation, congélation) ou de séchage (déshydratation, lyophilisation).

4. Toxicité

Les aflatoxines comptent parmi les substances naturelles ayant un potentiel cancérigène et mutagène le plus élevé. L'AFB1 est considérée comme étant le plus puissant cancérigène naturel connu pour l'homme (C.I.R.C , 2002). Les aflatoxines ont également des propriétés hépatotoxiques, tératogènes et immunotoxiques très marquées qui ont été mises en évidence dans les études sur les animaux. La consommation de fourrage contaminé par les animaux peut également entraîner des symptômes d'immunosuppressions, des hémorragies, une réduction du poids et le cancer du foie (Miller et Wilson, 1994 ; Wogan, 2000). Chez l'homme, les risques liés à la consommation d'aflatoxine ont été bien étudiée, et le C.I.R.C a classé l'aflatoxine comme agent cancérigène du foie (Wogan, 2000). Les études épidémiologiques réalisées dans le monde ont montré que les risques liés au développement du cancer du foie sont 30 fois plus élevés chez les individus ayant des antécédents d'hépatites B (Henry et Bosch, 2001). Cette situation est souvent rencontrée dans les pays en voie de développement, pour lesquels il n'existe pas de législation régulant les concentrations d'aflatoxines dans l'alimentation, et dans lesquels la vaccination contre l'hépatite B n'est pas appliquée de façon systématique pour des raisons économiques et/ou politiques.

Bien que la toxicité aiguë des aflatoxines soit rarement observée chez l'homme, des épidémies suite à l'ingestion d'aliments fortement contaminés ont été rapportées récemment dans les pays d'Afrique, en Inde et en Malaisie. La dernière épidémie d'intoxication par des aflatoxines a eu lieu en 2004 au Kenya et a été attribuée à l'ingestion de maïs très contaminé (CDC, 2004). Chez les animaux, l'intoxication aiguë par les aflatoxines peut se manifester par un malaise, une perte de l'appétit puis un ralentissement du gain de poids, un ictère, une ascite et le décès (Wogan, 2000). L'exposition alimentaire aux doses massives d'aflatoxines peut, dans certains cas, provoquer une aflatoxicose aiguë, dont le tableau clinique ressemble à celui d'une hépatite aiguë avec des vomissements, des douleurs abdominales, l'ictère, l'hépatomégalie, des œdèmes et dans certains cas, le décès.

Concernant la toxicité chronique, des études épidémiologiques ont clairement établi l'implication de l'AFB1 dans l'étiologie du cancer primaire du foie chez l'homme. Les relations admises entre l'incidence de cancers primitifs du foie chez l'homme, observés dans certains pays tropicaux, et l'exposition à l'aflatoxine B1, suite à la contamination alimentaire, ont conduit les experts du C.I.R.C à classer les aflatoxines (mélanges naturels des quatre aflatoxines) dans le groupe 1 des agents cancérigènes pour l'homme. L'exposition chronique aux aflatoxines est responsable du cancer chez diverses espèces animales. En effet, l'AFB1, mais également le mélange des quatre aflatoxines (B1, B2, G1 et G2) induisent des tumeurs hépatiques chez le canard, la truite, le saumon et le singe. Des tumeurs de reins, de la vésicule biliaire, du pancréas et de la vessie

peuvent également avoir lieu, ainsi que des leucémies (A.F.S.S.A, 2006). La fréquence des tumeurs rénales et de l'adénome du colon est augmentée en cas de déficience en vitamine A. D'après Pfholl-Leszkoicz et Castegnaro (2002), l'AFB1 est un très puissant cancérigène hépatique, alors que l'AFG1 induit plutôt des tumeurs rénales. L'apparition de ce type de tumeurs paraît liée non seulement à l'ingestion de produits très contaminés, mais aussi à la sous alimentation, aux carences vitaminiques et protéiques, ainsi qu'à l'hépatite B, fréquentes dans les populations concernées. L'ordre de toxicité des aflatoxines est AFB1>AFG1>AFB2>AFG2. L'aflatoxine M1, le métabolite de l'AFB1, est 10 fois moins toxique que l'AFB1 (Bhatnagar *et al.* 2002).

5. Mécanismes d'action et métabolisme

Dans les modèles animaux, l'effet cancérigène et mutagène de l'AFB1 est dû à sa biotransformation (ou bioactivation) dans l'organisme par l'intervention des cytochromes P450 hépatiques. Suite à une oxydation microsomiale sous contrôle des cytochromes P450 hépatiques, l'AFB1 est transformée dans l'organisme en métabolites divers, dont un dérivé époxyde (AFB1-8,9-époxyde). Il existe deux isomères d'AFB1-8,9-époxyde (Figure 12). L'exo-époxyde est le principal métabolite responsable des adduits à l'ADN, l'endo-époxyde est beaucoup moins toxique. L'AFB1-8,9-époxyde est un métabolite responsable de l'effet cancérigène et mutagène de l'AFB1.

Plusieurs mécanismes moléculaires contribuent à expliquer le risque élevé de développement de carcinome hépatocellulaire lors de l'exposition simultanée au virus de l'hépatite B (VHB) et aux aflatoxines. L'infection par le VHB peut augmenter le métabolisme des aflatoxines; chez la souris, des lésions du foie sont associées à l'expression augmentée des enzymes du cytochrome P450; l'activité de la glutathion-S-transférase est réduite en cas d'infection par le VHB (C.I.R.C , 2002). Certains scientifiques considèrent que chez l'homme, les aflatoxines n'agiraient pas comme cancérigène primaire, mais plutôt comme suppresseur des réactions immunitaires à médiation cellulaire favorisant le nombre de porteurs de VHB. Parmi d'autres multiples effets néfastes des aflatoxines, on retrouve un découplage de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries.

IV. L' ochratoxine A

1. Origine, structure et propriétés physico-chimiques

L'ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine produite par plusieurs espèces de champignons des genres *Aspergillus* et *Penicillium* se développant en particulier sur les denrées alimentaires au cours de leur stockage. L'OTA a été isolée pour la première fois en 1965 à partir d'un isolat d'*Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe *et al.*, 1965). La formule brute de l'ochratoxine A est C₂₀H₁₈ClNO₆. Elle est constituée d'une molécule de 3-méthyle-5-chloro-8-hydroxy-3,4 dihydro-

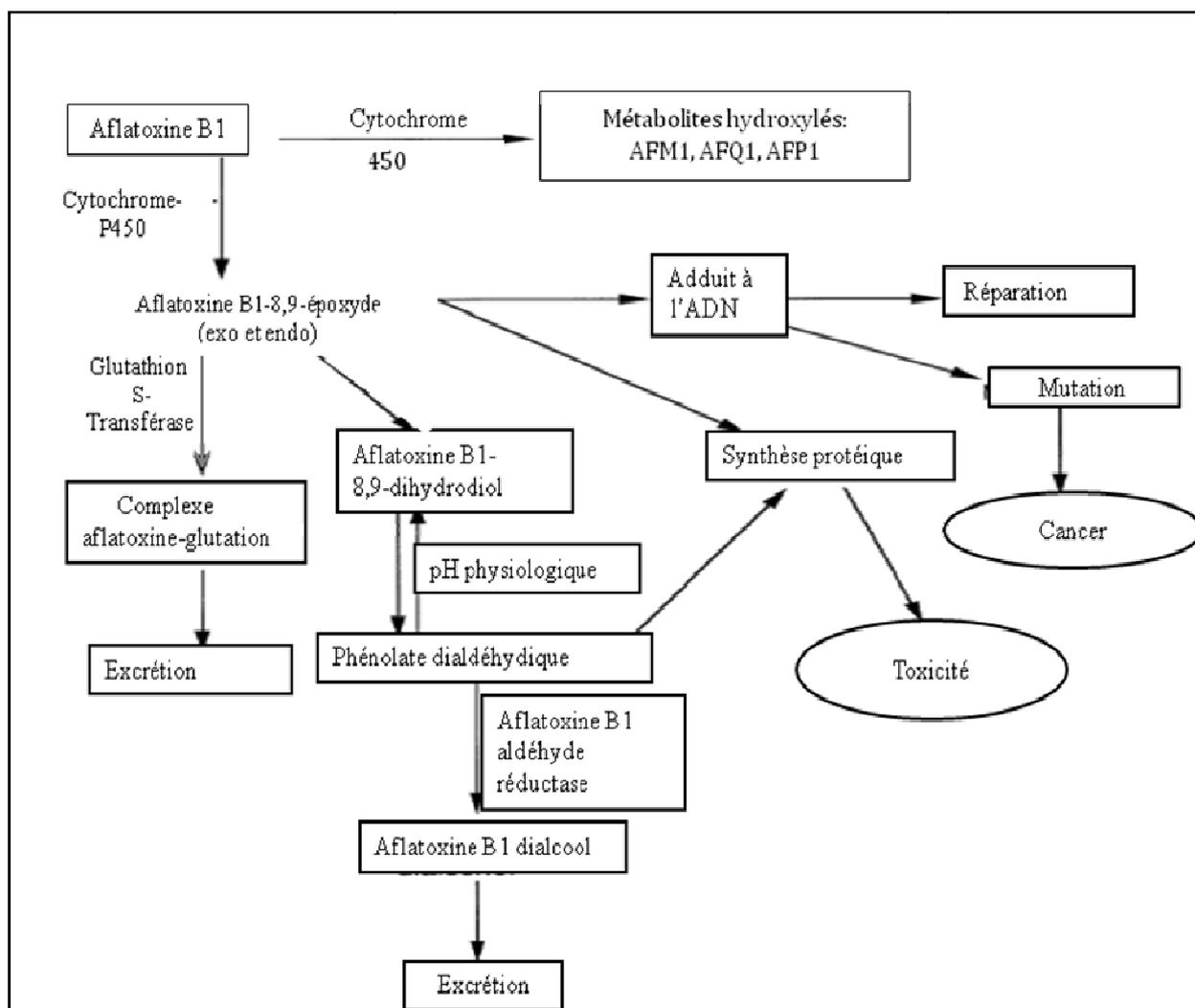


Figure 12. Voies de biotransformation de l'aflatoxine B₁ (Bammler *et al.*, 2000).

isocoumarine liée par une liaison peptidique, au niveau de son groupement carboxyle en C7, au groupement amine de la L- β -phénylalanine. La structure chimique générale des ochratoxines et celle de l'ochratoxine A sont illustrées dans la figure 13. Le groupe isocoumarine dans la molécule d'OTA est un squelette de pentakétide formé à partir d'acétate et de malonate par le biais du métabolisme des polycétones. La portion hétérocyclique est structurellement liée à la melléine, un métabolite fongique assez répandu. L'atome de chlore est incorporé dans le pentacétone par l'action d'une chloropeptidase. La L-phénylalanine provient du métabolisme de l'acide shikimique et est liée à la structure générale à travers le groupement carboxyle (Moss, 1996).

L'OTA de masse moléculaire de 403,8 g/mol est un acide organique faible ayant un pKa de 7,1. A pH acide ou neutre, elle est soluble dans les solvants organiques polaires et très peu soluble dans l'eau. A pH alcalin, elle devient soluble et stable en solution aqueuse. L'OTA possède un maximum d'absorption à 333 nm avec un coefficient d'extinction molaire (ϵ) de 5500 /mol/cm dans le méthanol. Son spectre d'absorption U.V. varie avec le pH et la polarité du solvant. En raison de sa structure, l'OTA se révèle stable et résiste généralement aux procédés de transformations industrielles. Il existe d'autres formes d'ochratoxines comme l'ochratoxine (B, C, α et β). Bien que les ochratoxines A, B, et C aient des structures très proches entre elles, leur potentiel toxique respectif est différent. L'OTA étant à la fois la plus toxique et la plus répandue.

2. Contamination des denrées alimentaires en OTA

L'ochratoxine A est détectée dans pratiquement toutes les céréales (maïs, blé, sorgho, riz, seigle, orge et avoine) et a été retrouvée dans de nombreuses autres denrées (graines de soja, haricots, grains de café vert, produits cacaotés, vin, jus de raisins, raisins secs, bière, épices et herbes) (Pittet, 2001). L'homme peut donc s'exposer à l'OTA *via* la chaîne alimentaire en consommant des produits contaminés. Selon le recensement international effectué par le comité mixte d'experts F.A.O/O.M.S (J.E .C.F.A), la majorité des données de contamination actuellement disponibles proviennent de l'Europe (85%). Le tableau 14, présente une synthèse des données sur la contamination des différents produits par l'OTA (Miraglia et Brera, 2002). On ne dispose actuellement pas de données de contamination pour tous les pays qui sont potentiellement concernés au vu de leurs conditions climatiques, de leurs régimes alimentaires et/ou de pratiques agricoles particulières.

On constate d'après les données du tableau 14, que la contamination des aliments par l'OTA est relativement ubiquitaire et courante et que la fréquence et les niveaux de contamination sont variables. D'après SCOOP Task 3.2.7, European (2002), l'OTA a été détectée dans 55 % des

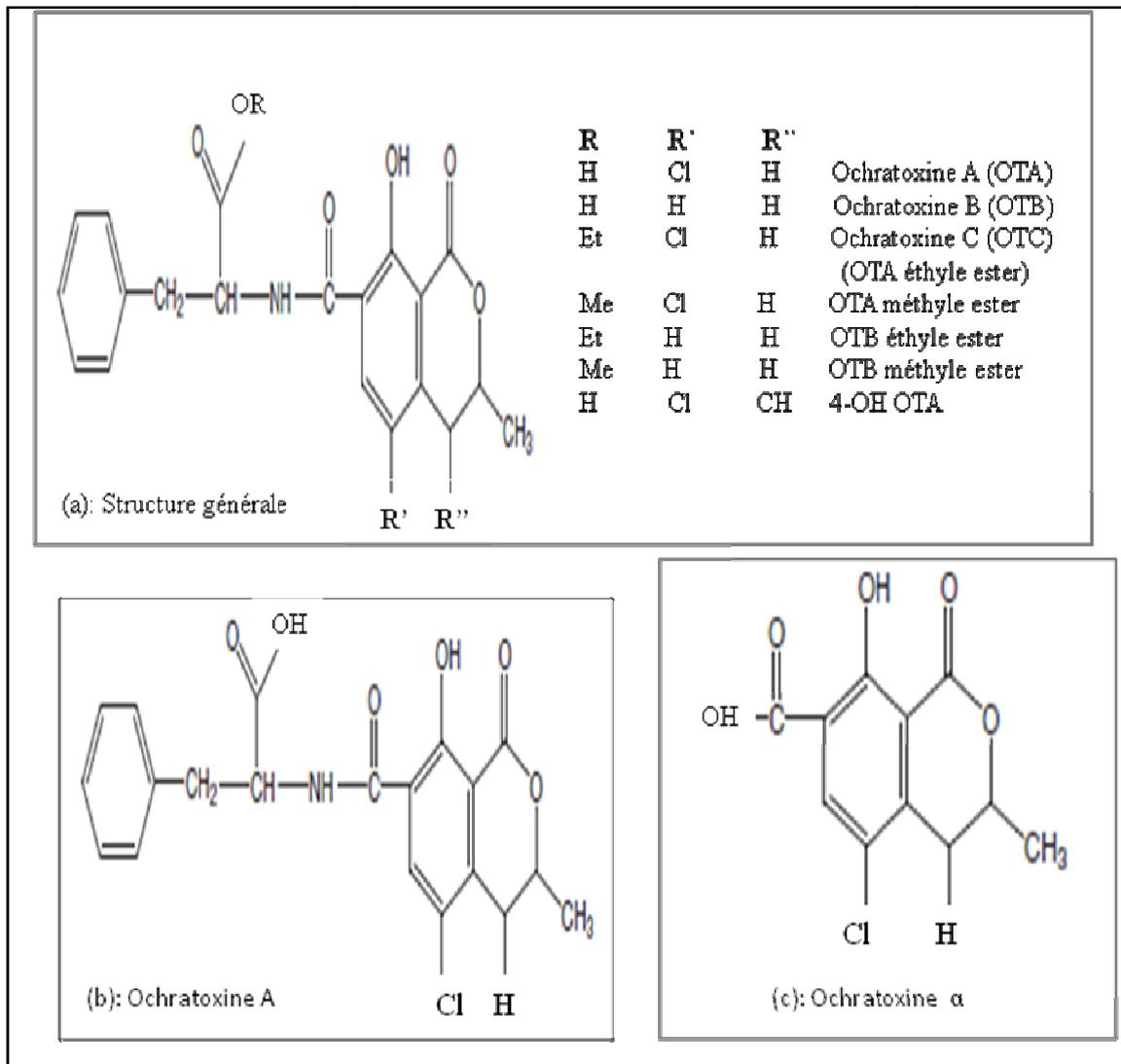


Figure 13. Structure chimique générale des ochratoxines (a), l'ochratoxine A (b), l'ochratoxine α (c) et l'ochratoxine β (d) (Marquardt et Frohlich, 1992).

Tableau 14. Données concernant la fréquence et le taux de contamination en OTA de divers aliments (Miraglia et Brera, 2002).

Produits alimentaires	Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons positifs	Pourcentage d'échantillons positifs	Ochratoxine A (µg/kg)	
				Moyenne ^a	Moyenne ^b
Céréales (ensemble)	5180	2825	55	0,294	0,484
Blé	979	273	28	0,269	0,700
Maïs	267	35	13	0,165	0,719
Avoine	164	49	30	0,192	0,465
Sorgho	34	24	70	0,136	0,120
Seigle	444	236	53	0,597	1,095
Orge	142	34	24	0,301	1,061
Riz	63	4	6	0,217	0,725
Café vert	1704	620	36	1,620	3,641
Café torréfié	1184	549	46	0,724	1,092
Cacao et dérivés	547	445	81	0,236	0,277
Fruits secs	800	582	73	2,298	3,078
Viande	1860	328	18	0,198	0,830
Epices	361	188	52	1,150	5,061
Bière	496	192	39	0,028	0,032
Vin	1470	872	59	0,357	0,591
Autres ^c	4927	2472	50	0,197	0,551

^aSur la totalité des échantillons.

^bSur les échantillons positifs.

^cBeurre, haricots secs, jus de raisin, huile d'olive, etc.

échantillons de céréales et dans 28% des échantillons de blé analysés. Ainsi, les céréales constituent la source principale de la consommation d'OTA. Une étude réalisée en France par Verger *et al.* (1999) a montré que les trois quarts de l'OTA ingérée par l'homme a pour origine le blé. Ceci est attribué au fait que le blé est à la base de l'alimentation humaine et qu'il est fréquemment contaminé par l'OTA. Dans certaines conditions climatiques, la présence d'OTA sur les grains de céréales est attribuée à une forte humidité lors du stockage. Pendant la durée du stockage dans les silos, le taux d'humidité et la température du lot jouent un rôle primordial dans la production de cette toxine.

En outre, grâce à sa structure chimique, l'OTA présente une grande stabilité et n'est dégradée que partiellement au cours des procédés de transformation des aliments (cuisson, fermentation, torréfaction, etc.). C'est pourquoi, elle est retrouvée dans les produits dérivés de matières premières contaminées ainsi que dans la viande (Jorgensen, 1998; Verger *et al.*, 1999) ou le lait obtenus à partir d'animaux ayant reçu une alimentation contaminée. L'OTA est retrouvée tout au long de la chaîne de transformation des céréales (Alldrick, 1996). En effet, plusieurs travaux ont rapporté la présence de l'OTA dans produits dérivés du blé contaminé. Une analyse des céréales du petit-déjeuner a mis en évidence la présence d'OTA dans 69% des échantillons testés, dont 20% avait un taux supérieur à la norme en vigueur (Molinié *et al.*, 2005). L'OTA a également été retrouvée dans les aliments pour bébés à base de céréales, dans les biscuits, le pain ou les pâtes alimentaires (Araguas *et al.*, 2005). Il convient cependant de noter que la voie respiratoire est depuis peu envisagée comme voie possible d'exposition complémentaire en zone agricole (Richard *et al.* 1999; Skaug *et al.* 2001) et en milieu professionnel (Iavicoli *et al.*, 2002).

3. Méthodes d'analyse de l'ochratoxine A

3.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

L'utilisation de la CCM permet une détection mais rarement une quantification de l'OTA. Plusieurs protocoles ont ainsi été développés par l'A.O.A.C (1995) (Official Methods 973.37 et 975.38), notamment pour la recherche de l'OTA. D'après Lin *et al.* (1998), les paramètres de CCM idéaux pour la détection de l'OTA sont les suivants:

- type de couche mince: gel de silice (silica gel);
- solvant de séparation: toluène/éthyle acétate/d'acide formique à 90 % (5:4:1, v/v/v);
- système de détection: lampe U.V. (365 nm ou 254 nm);
- méthode de quantification densité fluorimétrique à 365 nm.

3.2. HPLC (high performance liquid chromatography)

L'HPLC est une méthode de choix pour l'analyse de nombreuses mycotoxines pour ses performances en termes de vitesse, automation et précision. Le système HPLC pour l'OTA nécessite l'utilisation d'une colonne analytique de type C-18, 5 μm et d'une phase mobile composée d'acétonitrile/eau/acide acétique (99:99:2, v/v/v), délivrée à un débit de 1 mL/min. L'acidification de la phase mobile permet d'éviter l'élution de l'OTA avec le front du solvant. La détection par fluorescence est possible directement, sans dérivation. Le fluorimètre est réglé aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission $e_{xc.} = 330 \text{ nm}$ et $\lambda_{em.} = 460 \text{ nm}$ (Bragulat *et al.*, 2001). Le système HPLC associé à un détecteur à fluorescence et à un détecteur U.V. (à barrettes de diode) est considéré comme la meilleure méthode d'analyse de l'OTA (Rizzo *et al.*, 2002, Samson *et al.* 2006).

3.3. Méthodes immuno-enzymatiques (EIA) (Enzyme-Immuno Assay)

Il s'agit d'une technique de détection rapide basée sur la mise en place d'une réaction antigène-anticorps. L'antigène est ici l'OTA à doser et l'anticorps est une immunoglobuline anti-OTA produite par réaction immunitaire chez un animal. La plus répandue de ces méthodes est l'ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Elle s'effectue souvent sur plaque de microtitration de 96 puits qui, avec l'établissement d'une gamme étalon, représente le dosage quantitatif d'origine immunologique le plus utilisé (Monaci et Palmisano, 2004).

Les colonnes d'immunoaffinité sont utilisées dans le cadre d'une purification préalable de l'échantillon avant le dosage quantitatif par HPLC. L'immunopurification consiste en la purification d'aflatoxines ou d'ochratoxines à partir d'un extrait d'échantillon par passage sur une colonne d'immunoaffinité qui contient un support garni d'anticorps dirigés spécifiquement contre ces mycotoxines (Wilson, 1999). Il existe sur le marché des colonnes d'immunoaffinité spécifique de l'OTA et des aflatoxines. Dans tous les cas, il est impératif de se conformer aux prescriptions des fournisseurs de colonnes.

Il convient de signaler que l'extraction et la purification sur colonne d'immunoaffinité (IAC) sans acidification, conduit à une sous-estimation de la contamination par l'OTA. En effet, une partie de l'OTA est transformée lors de l'extraction en OP-OTA (forme ouverte) n'est pas retenue sur la colonne d'IAC (Canadas 2006; Castegnaro *et al.*, 2006).

3.4. Méthodes de confirmation

La confirmation de la présence de l'OTA peut être réalisée de deux manières:

- confirmation par la formation du méthyl-ester de l'ochratoxine A (Lerch et Muller, 1990).

La technique consiste évaporer l'extrait méthanolique de l'échantillon et de reprendre le résidu dans

1 ml d'une solution méthanolique de trifluorure de bore à 14%. Le flacon bouché est maintenu au bain-marie à 60°C pendant 15 min. La concentration est ensuite calculée par comparaison à une courbe standard.

- confirmation par action de la carboxypeptidase sur l'ochratoxine A: l'extrait méthanolique d'un échantillon est repris après évaporation par 0,9 ml d'une solution de Tris-HCl/NaCl 0,04 M, pH 7,5 et additionné de 10 µl de la solution de carboxypeptidase. Après incubation à 37°C pendant 2 h, on obtient de la phénylalanine et de l'ochratoxine α (OTα) qui donne un pic à un temps de rétention faible.

4. Toxicité et évaluation du risque lié à l'OTA

La présence d'OTA dans les aliments représente un danger pour la santé humaine et animale. Initialement incriminée dans la survenue de néphropathies en élevage porcin (Krogh *et al.*, 1976), l'OTA présente des effets néphrotoxiques chez toutes les espèces de mammifères testées expérimentalement (O.M.S, 2002). Cette mycotoxine a été rapportée néphrotoxique, hépatotoxique, tératogène et immunosuppressive chez l'homme. Elle a été classée en 1993 par le C.I.R.C comme "potentiellement cancérigène pour l'homme" (groupe 2B). Chez les animaux, elle est clairement cancérigène au niveau du rein (Faucet-Marquis, 2005). Le mécanisme par lequel cette toxine induit des cancers n'est pas totalement élucidé. L'implication étiologique de l'OTA dans la Néphropathie Endémique des Balkans (NEB) a été évoquée dès 1976 (Krogh *et al.*, 1976; Petrova-Bocharova *et al.*, 1988) et étudiée par diverses équipes de recherche. Cette affection semble être multi-factorielle (Toncheva *et al.* 1998) et le rôle de l'OTA reste encore incertain (Pfohl-Leszkowicz *et al.* 2002b).

D'après les études réalisées en Algérie (Khalef *et al.*, 1993), en Tunisie (Eko-Ebongue, 1994; Maaroufi *et al.*, 1995a,b), en Egypte (Wafa *et al.*, 1998) et au Maroc (Filali *et al.* 2002), l'OTA serait responsable des néphropathies interstitielles chroniques. Cette toxine a été aussi détectée dans des échantillons de sang humain d'individus en bonne santé de divers pays du monde (Keeper-Goodman et Scott, 1989; Thuvander *et al.*, 2001). La présence par ordre décroissant des groupements carboxyle (de la phénylalanine), chlore (en C5) et hydroxyle (en C8) favoriseraient la toxicité *in vitro* et *in vivo* de l'OTA (Xiao *et al.*, 1996 a,b). Selon ces derniers le groupement phénylalanine permet à l'OTA d'atteindre les cibles cellulaires, ce qui explique d'ailleurs le peu de toxicité de l'OTα.

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel

1. Blé et dérivés

Dans cette étude nous avons utilisé des variétés de blé dur (*Triticum durum*) et de blé tendre (*Triticum aestivum*) et leurs produits transformés (farine, semoule et son de blé). Selon les cas, les échantillons de blé ont été récoltés au champ, pendant le stockage dans les silos au niveau des coopératives des céréales et des légumes secs (CCLS) et dans des unités de transformation des céréales (meunerie et semoulerie).

2. Milieux de culture

Les milieux de cultures utilisés pour les isolements et l'identification morphologique des principaux genres et espèces fongiques ainsi que pour la production des aflatoxines et de l'OTA sont les suivants:

- Milieu PDA (Potato, Dextrose, Agar) (Raper et Fennell, 1965).
- Milieu MEA (Malt Extract, Agar) (Pitt et Hocking, 1997).
- Milieu DRBC (Dichloran, Rose Bengal, Chloramphénicol) (King *et al.*, 1979).
- Milieu CYA (Czapek, Yeast, Agar) (Pitt et Hocking, 1997).
- Milieu Czapek agar (Pitt et Hocking, 1997)
- Milieu CAM (Coconut Agar Medium) (Davis *et al.*, 1987).
- Milieu extrait de blé (Ramos *et al.*, 1998).

La composition chimique de ces milieux est donnée en annexe I.

3. Souches de références

Les études moléculaires et du pouvoir producteur d'aflatoxines des isolats a nécessité l'utilisation de deux souches de références : *Aspergillus flavus* NRRL 3251^T et *A. parasiticus* CBS 100926^T, fournies respectivement par l'INRA de Toulouse et le Pr. Jens C. Frisvad (Center for Microbial Biotechnology, BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark).

4. Appareillage, produits chimiques et standards analytiques

Les appareils, les produits chimiques et les standards analytiques utilisés dans cette étude sont donnés en annexe II. Les solvants et les acides utilisés pour l'extraction et la détection des mycotoxines, ainsi que pour l'extraction des acides nucléiques, sont de qualité ultrapure,

compatibles avec une analyse HPLC et moléculaire. L'eau utilisée en HPLC comme phase mobile et en biologie moléculaire ou pour la préparation des solutions est de qualité ultrapure, préparée avec le système de purification MilliQ (Millipore SA, Molsheim, France).

5. Chaînes chromatographiques de type HPLC

Le dosage des aflatoxines et de l'ochratoxine A a été réalisé respectivement sur les deux chaînes chromatographiques suivantes:

- Système de chromatographie liquide à haute performance (Shimadzu, Kyoto, Japon) avec un détecteur de fluorescence (Spectra Physic 2000) équipé d'une cellule de dérivation (KOBRA Cell) post-colonne et d'un logiciel d'exploitation (Normasoft).

- Système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (BIO-TEK, Milan, Italie) avec une colonne C18, un détecteur U.V. à barrettes de diodes (diode array detector 545V) et un logiciel d'exploitation (Kroma 3000).

La description détaillée de ces deux chaînes chromatographiques est donnée en annexe III.

II. Site d'étude et échantillonnage

1. Sites d'étude

Les sites de prélèvements des échantillons de blé sont localisés dans deux régions représentant les deux climats caractérisant la céréaliculture en Algérie (Figure 14):

- La zone de la Mitidja et régions voisines, regroupant les régions de Blida, Rouiba, Boumerdès et Tizi Ouzou. Ces régions représentent les plaines fertiles de la région tellienne. Le climat est de type méditerranéen caractérisé par des étés chauds et secs et des hivers humides et frais. Le choix de cette zone est justifié par la présence d'une part, des champs de blé et d'autre part, de Coopératives des Céréales et des Légumes Secs (CCLS) qui se chargent de la collection des productions des régions avoisinantes.

- La région de Sétif représentant les hauts plateaux où la céréaliculture occupe la première place des activités agricoles en Algérie. Cette région possède un climat caractérisé par des étés lourds et secs et des hivers très froids et humides.

2. Collection des échantillons

Au cours de cette étude, un total de 108 échantillons de blé a été analysé. Quatre vingt cinq échantillons proviennent de la récolte de 2004 et 23 échantillons proviennent de la récolte de 2006.

Les 85 échantillons de la récolte de 2004 sont de 3 catégories:

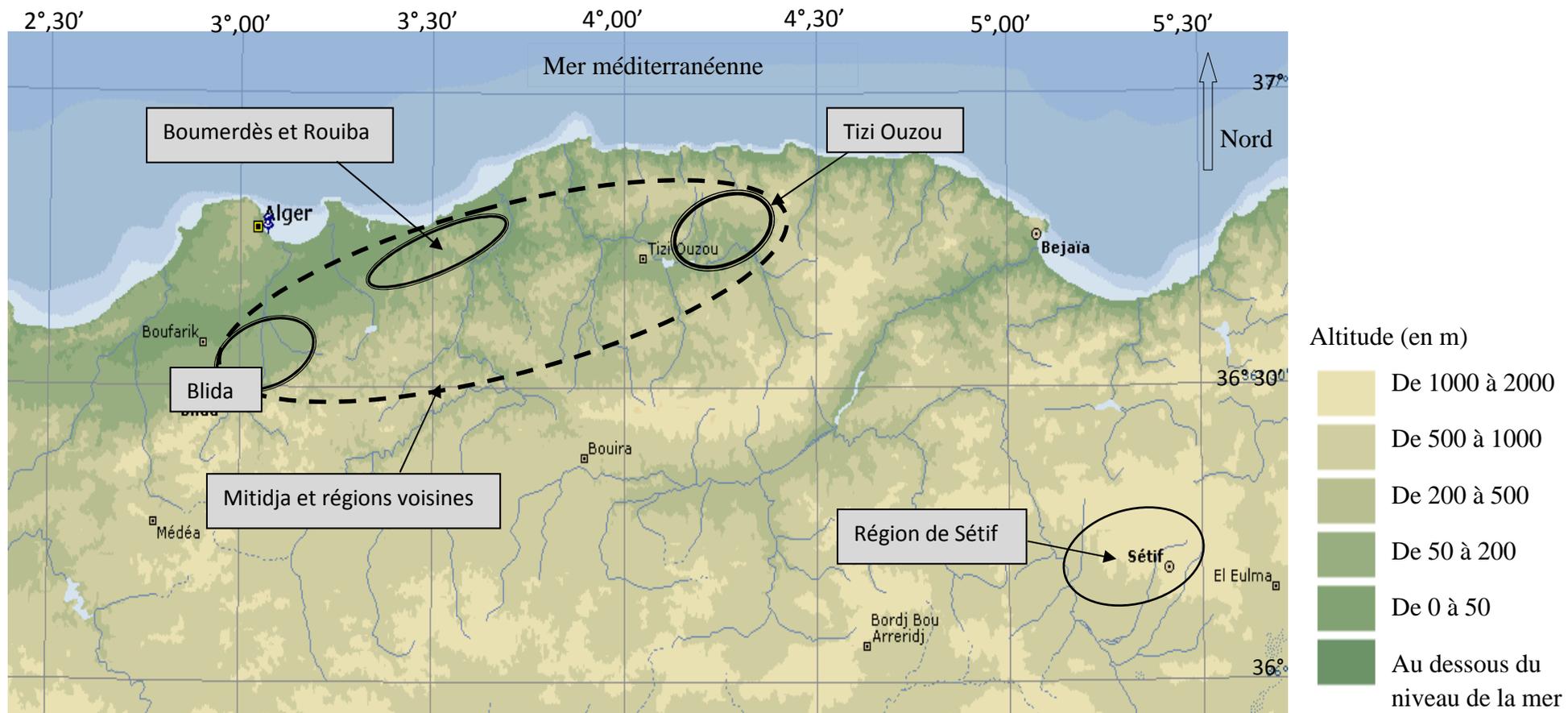


Figure 14. Localisation géographique des régions de prélèvements des échantillons de blé et dérivés.

- blé de pré-récolte (27 échantillons);
- blé stocké dans les silos (34 échantillons);
- blé destiné à la transformation en farine, en semoule et le son de blé (24 échantillons).

Les caractéristiques des ces échantillons sont données dans le tableau 15 .

Les 23 échantillons de graines de blé de la récolte de 2006 ont été collectés, au mois d’Août, un mois après la moisson, au niveau des CCLS de Sétif, Blida et Tizi Ouzou et de l’ITGC de Sétif.

2.1. Echantillons de la récolte de 2004

2.1.1. Echantillons prélevés du champ

Durant la période de juillet 2004, vingt sept échantillons de blé dur ont été collectés dans trois parcelles d’une superficie d’un hectare chacune (Figure 15).

- Vingt échantillons de blé dur (variété Waha), ont été prélevés dans deux parcelles (10 échantillons/parcelle) situées respectivement à Ain Abbassa (Nord de Sétif) et Ain Arnat (Ouest de Sétif). La distance entre les deux parcelles est d’environ 15 km.

- Sept échantillons de blé dur (variété Vitron) ont été prélevés dans une parcelle située à Corso dans la région de Boumerdès.

Les prélèvements ont été effectués en diagonale selon le plan illustré dans la figure 15. La distance séparant deux échantillons est de 15 à 20 m. Chaque échantillon est composé de 40 à 50 épis issus de 4 à 5 points de prélèvements distants entre eux d’un à 2 m. Les grains ont ensuite été séparés manuellement des autres organes de l’épi et nettoyés pour éliminer balles, rachis et poussière.

Les températures minimales et maximales durant la période de prélèvements étaient de 18°C et 37°C respectivement, pour la région de Sétif, et de 22°C et 35°C pour la région de Boumerdès. La durée d’exposition de la lumière solaire est de 14 h. Dans les parcelles choisies pour les prélèvements des échantillons, les cultures de blé ne portent *a priori* pas de symptômes visibles à l’œil nu de maladies fongiques (ou autres).

2.1.2. Echantillons prélevés au silo

Trente quatre échantillons de blé dur stocké dans les silos ont été collectés. Le blé stocké correspond à des mélanges de variétés de blé dur provenant des différentes récoltes de chaque région. Les prélèvements ont été effectués par le personnel de CCLS pendant les deux périodes suivantes:

- en septembre 2005, dix échantillons de blé dur de la récolte de 2004 stocké durant 12 mois ont été prélevés au niveau de la CCLS de Draa Ben Khedda (Tizi Ouzou).

Tableau 15. Caractéristiques des échantillons de blé et dérivés collectés en 2004 à différentes phases (pré-récolte, stockage et transformation).

Origine	Région de Sétif		Région de Boumerdès	CCLS de Tizi Ouzou		Meunerie (blé tendre) (Tizi Ouzou)				Semoulerie (blé dur) (Boumerdès)			
	Champ ^a	Silo 1 ^c	Champ ^b	Silo 2 ^c	Silo 3 ^d	BPN ^e	BNC ^f	Farine	Son	BPN ^e	BNC ^f	Semoule	Son
Variété de blé	Waha	Mélange de variétés	Vitron	Mélange de variétés	Mélange de variétés	Blé tendre				Blé dur			
Nombre d'échantillons	20	10	7	14	10	3	3	3	3	3	3	3	3
Température (°C)	18 – 37	24	22- 35	27	35,5	24	28	36	ND	23	31	30	ND
Humidité relative	51	28	68	32	31	31	51	60	ND	30	50	57	ND

^a Grains de blé de la récolte 2004, prélevés dans 2 parcelles d'un hectare chacune situées à Ain Abbassa (Nord de Sétif) et Ain Arnat (Ouest de Sétif).

^b Grains de blé de la récolte 2004, prélevés dans un champ de blé situé à Corso (Boumerdès).

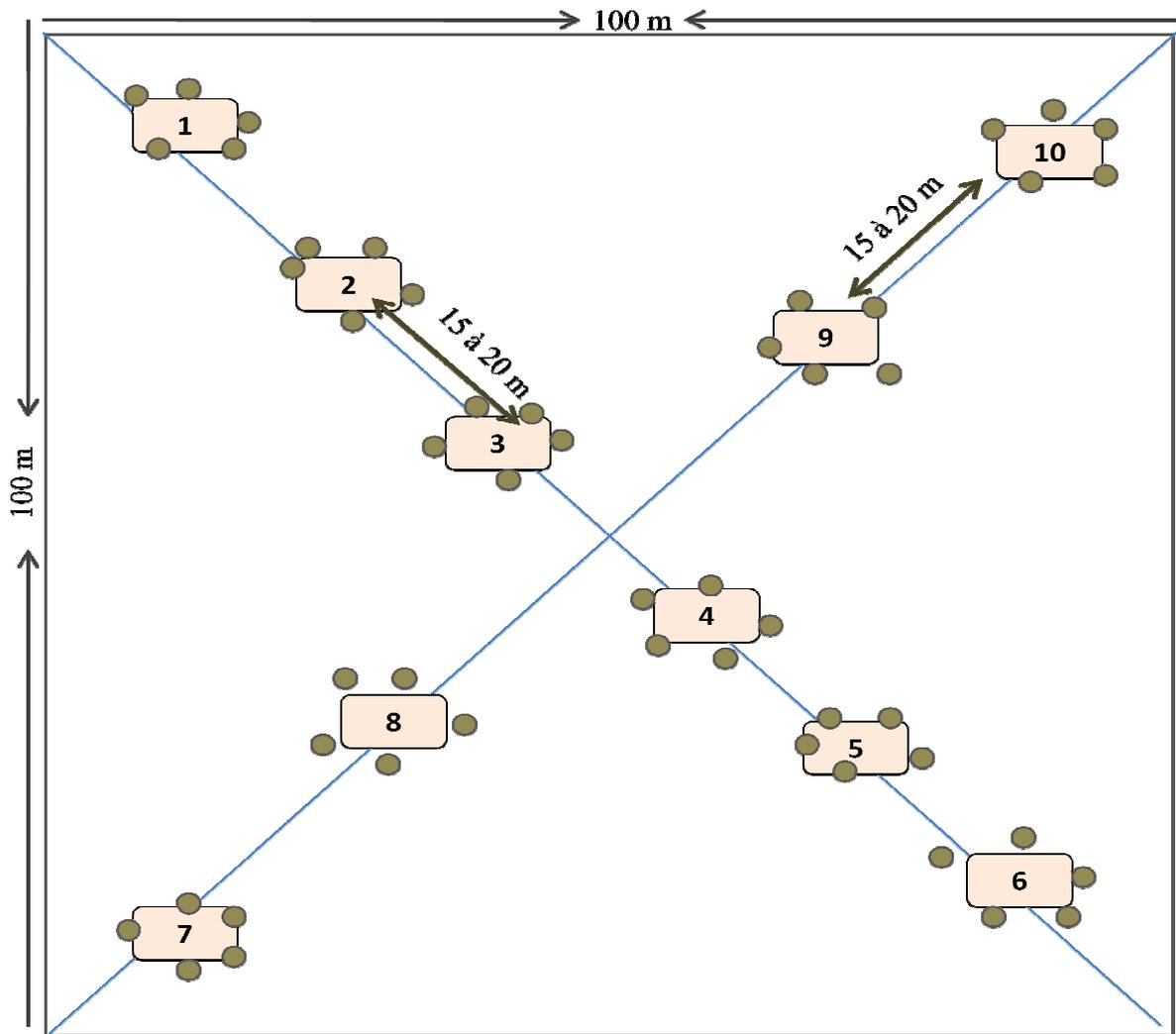
^c Grains de blé stockés durant 6 mois dans le silo (récolte de 2004).

^d Grains de blé stockés durant 12 mois dans le silo (récolte de 2004).

^e BPN: blé prénettoyé (débarrassé de grosses impuretés).

^f BNC: blé nettoyé conditionné (débarrassé de toute impureté et humidifié prêt).

ND : non déterminé.



: position des échantillons ● : Points de prélèvement

Chaque échantillon est constitué de 5 point de prélèvements ● .

Figure 15. Plan d'échantillonnage montrant les points de prélèvement des échantillons de blés collectés dans une parcelle d'un hectare.

- en février 2005, quatorze et dix échantillons de blé dur, stocké dans les silos durant six mois, ont été prélevés respectivement au niveau des CCLS de Draa Ben Khedda (Tizi Ouzou) et Sétif. Chaque échantillon représente une cellule de stockage et est constitué d'un mélange de 3 sous-échantillons de 300 à 400 g de graines prélevés à trois niveaux de chaque cellule de stockage (bas, milieu, et haut). Les trois sous-échantillons sont mélangés pour avoir un échantillon de 1 kg environ.

2.1.3. Echantillons prélevés au niveau d'une meunerie et d'une semoulerie

Vingt quatre échantillons de blé dur, de blé tendre et de leurs dérivés ont été collectés dans deux unités de production céréalière (UPC). Douze échantillons proviennent de la meunerie de Tademaït (Tizi Ouzou) et 12 autres de la semoulerie de Baghlia (Boumerdès). Le diagramme de la chaîne de transformation et le positionnement des points de prélèvement des échantillons sont présentés dans la figure 16.

Des échantillons de 1 kg ont été prélevés à 4 niveaux de la chaîne de transformation de chaque unité, suivant le plan d'échantillonnage de l'unité. Celui-ci consiste à prélever 3 échantillons échelonnés sur 3 jours consécutifs. Ainsi, les échantillons prélevés sont répartis comme suit:

- Trois échantillons de blé tendre prénettoyé (débarrassé de grosses impuretés) stocké durant un mois dans le silo de l'unité avant sa transformation en farine.

- Trois échantillons de blé dur prénettoyé stocké durant 45 jours dans le silo de l'unité avant sa transformation en semoule.

- Trois échantillons de blé nettoyé conditionné de chacune des 2 unités, soit un total de 24 échantillons, ont été prélevés. Le terme « blé nettoyé », désigne le blé débarrassé de toutes impuretés (poussières, pailles, graines étrangères, les petites graines, graines cassées et échaudées, débris métalliques, pierres) suivi d'une hydratation (mouillage) afin de lui conférer une humidité suffisante pour obtenir une bonne séparation entre l'amande et les enveloppes (élimination du péricarpe) avant mouture.

- Trois échantillons de chaque produit fini (semoule, farine et son de blé) ont été prélevés dans chaque unité (12 échantillons).

Les prélèvements ont été effectués le mois de mai 2005 par le personnel de l'unité, au cours des prélèvements destinés aux analyses de routine. Les échantillons ont été collectés dans des sacs en papier destiné à l'emballage des produits finis (farine et semoule). L'humidité relative et les températures dans les silos et les hangars d'entreposage, mesurées au moment des prélèvements, sont données dans le tableau 15.

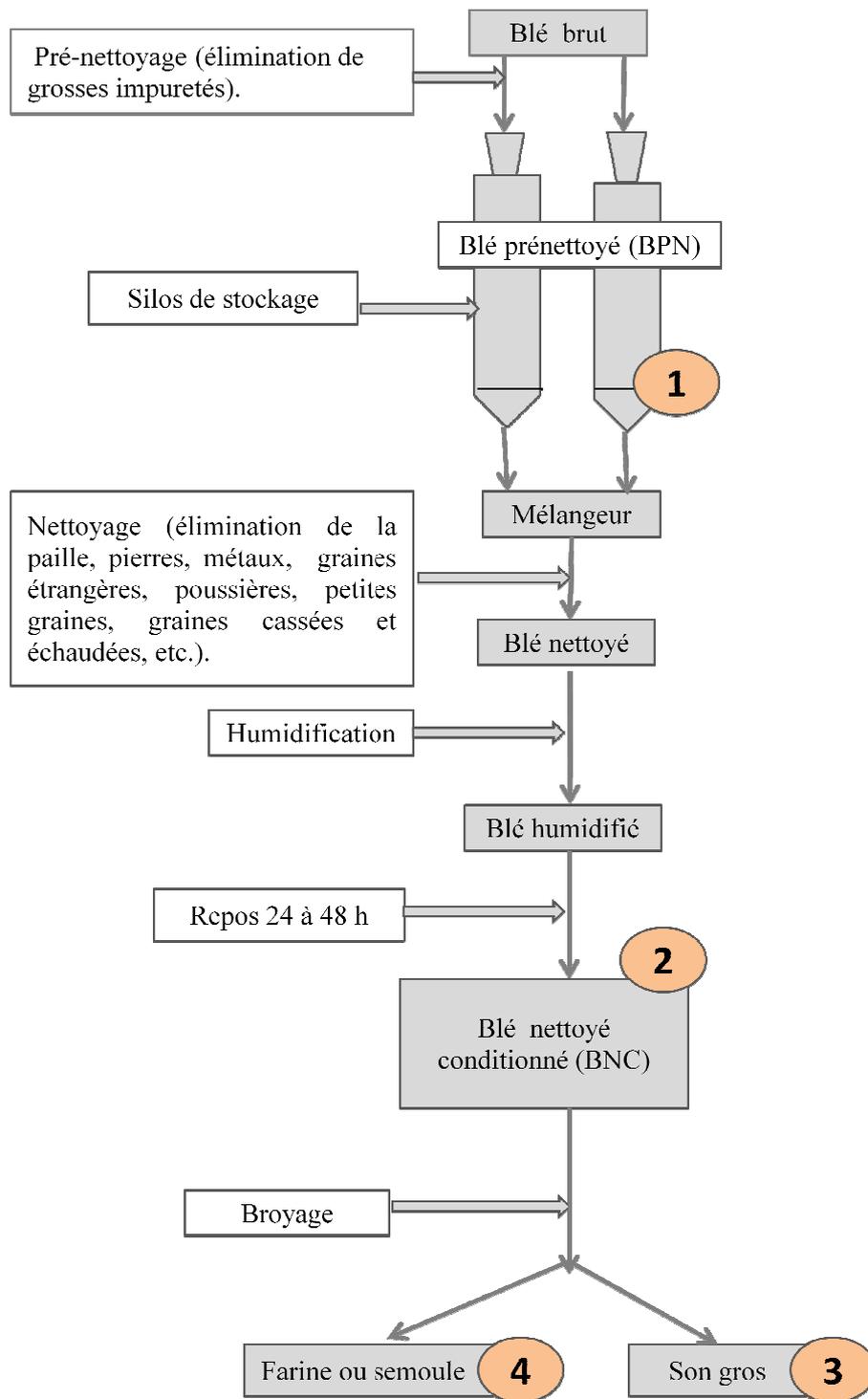


Figure 16. Diagramme de transformation de blé dans une meunerie ou semoulerie montrant le positionnement des 4 niveaux de prélèvement des échantillons.

①, ②, ③ et ④ = niveaux de prélèvement (3échantillons par niveau).

2.2. Echantillons de la récolte de 2006

Un total de 23 échantillons de blé brut de la récolte de 2006 a été collecté en Août 2006, un mois après la moisson au niveau des CCLS de Sétif, Blida et Tizi Ouzou et de l'ITGC de Sétif. Les graines de blé étaient conditionnées dans des sacs en jute de capacité de 100 kg, empilés sur palettes et entreposés dans les hangars. Chaque échantillon est constitué d'un mélange de 3 prélèvements d'environ 300 à 400 g provenant de 3 sacs de même variété et de même localité. Les caractéristiques des échantillons prélevés sont présentées dans le tableau 16.

Dans tous les cas, la totalité des graines de blé de chaque échantillon est broyée finement à l'aide d'un broyeur afin d'obtenir un échantillon homogène. Chaque échantillon est ensuite divisé en 2 lots, l'un destiné à l'analyse de la flore fongique qui est réalisée aussitôt après les prélèvements et l'autre lot, conservé à - 20°C pour l'analyse des aflatoxines et de l'ochratoxine A.

III. Méthodes d'identification et d'analyse

1. Isolements et dénombrement de la flore fongique

L'isolement et le dénombrement des moisissures dans les échantillons ont été réalisés par la technique des suspension-dilutions et ensemencement sur milieu gélosé (Pitt et Hocking, 1997). Dix grammes de chaque échantillon de graines de blé broyées ou de produit fini (semoule, farine) sont additionnés à 90 ml d'eau peptonée à 0,1% et homogénéisé par agitation de 15 min. Des dilutions décimales (10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4}) sont réalisées à partir de la solution mère. Cent microlitres de chaque dilution sont ensemencés sur la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu DRBC (King *et al.*, 1979). Trois répétitions sont réalisées par dilution. L'incubation a lieu à 28°C pendant 5 à 7 jours à l'obscurité. La numération est effectuée en choisissant les boîtes dont le nombre de colonies est compris entre 10 et 60 environ. Le nombre de moisissures est exprimé en colonies formant unité par gramme d'échantillon (cfu/g). Les isolats représentatifs de chaque échantillon sont purifiés puis repiqués dans des tubes à essai contenant le milieu gélosé à base d'extrait de malt (MEA) (Pitt et Hocking, 1997). Après incubation de 7 à 10 jours à 28°C, les isolats sont conservés à 4°C pour les analyses ultérieures.

2. Identification des isolats fongiques

2.1. Identification morphologique

La reconnaissance des principaux genres et espèces fongiques repose sur l'observation des caractères macromorphologiques et micromorphologiques suivants: l'aspect de la colonie (couleur, texture), le mode de groupement des conidies (spores), le mode de conidiogénèse, l'agencement des

Tableau 16. Caractéristiques des échantillons de blé de la récolte 2006 collectés un mois après la moisson au niveau des CCLS de Blida, Tizi Ouzou et Sétif et de l'ITGC de Sétif.

Code de l'échantillon	Variété de blé	Localité	Région	Nombre d'échantillons
R1	BT Hidhab nettoyé	Rouiba	Alger	1
R3	BD Hoggar nettoyé	Rouiba	Alger	1
L	BD Ghen's nettoyé	Rouiba	Alger	1
N	BD Ghen's brut	Mouzaïa	Blida	1
O	Vitron brut	Ahmer El-Ain	Blida	1
B11	BD Ghen's brut	Blida	Blida	1
M1, M2	BT HD 1220 brut	Mouzaïa	Blida	2
BO1	BD Ghen's	Boumerdès	Boumerdès	1
BO2	BD Vitron	Boumerdès	Boumerdès	1
IS	BT Hidhab	Les Issers	Boumerdès	1
A	BD Waha nettoyé	Béni Fouda (Est de Sétif)	Sétif	1
B	BD MBB brut	Ain Arnat (Ouest de Sétif).	Sétif	1
D	Waha locale Brut	ITGC de Sétif	Sétif	1
G	BT El-Hidhab nettoyé	ITGC de Sétif	Sétif	1
H	MBB nettoyé	ITGC de Sétif	Sétif	1
I	MBB nettoyé	Ain Abbassa (Nord de Sétif)	Sétif	1
J	Waha Brut	Béni Fouda (Est de Sétif)	Sétif	1
K, S6	MBB nettoyé	Ain Arnat (Ouest de Sétif).	Sétif	2
S8	Waha Brut	Béni Fouda (Est de Sétif)	Sétif	1
T1	BD Ghen's	Tademaït (Ouest de Tizi Ouzou)	Tizi-Ouzou	1
T2	BD Vitron	Fréha (Est de Tizi Ouzou)	Tizi-Ouzou	1

BT : blé tendre. BD : blé dur.

cellules conidiogènes et la taille, l'ornementation et la couleur des conidies. L'étude des caractères macro et micromorphologiques des moisissures isolées est effectuée sur milieux CYA (Pitt et Hocking, 1997) et sur milieu MEA à 25°C pendant 5 à 7 jours d'incubation (Raper et Fennell, 1965; Pitt et Hocking, 1997).

La production de sclérotés par les *Aspergillus* section *Flavi* (caractère taxonomique important) est réalisée selon la méthode utilisée par de nombreux auteurs (Novas et Cabral, 2002 ; Pildain *et al.*, 2004; Abbas *et al.*, 2006). Elle consiste à cultiver les isolats à tester sur milieu gélosé Czapek agar (CZA) à 30°C à l'abri de la lumière. La production des sclérotés est suivie périodiquement pendant 3 semaines. Le diamètre des sclérotés (moyenne de 50 à 60 sclérotés par souche) est obtenu en les déposant sur une plaque quadrillée à mailles de 500 µm et après observation à l'aide d'une loupe. Le morphotype « L » produit des sclérotés de taille comprise généralement entre 500 µm et 800 µm. Par contre le morphotype « S » produit des sclérotés de taille inférieure, allant de 200 à 300 µm.

2.2. Identification moléculaire.

Les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* ayant fait l'objet d'une identification moléculaire ont été sélectionnés en fonction des résultats obtenus de l'étude morphologique, de la production d'aflatoxines, d'acide cyclopiazonique et des sclérotés.

2.2.1. Préparation du mycélium

Les souches sontensemencées dans des Erlenmeyer (250 ml) contenant 150 ml de milieu de culture liquide à base de pomme de terre et de dextrose (PDB). L'incubation a lieu pendant 48 h à 28°C sous agitation continue. Le mycélium est récupéré après filtration de la culture liquide à travers une membrane en nitrocellulose de 0,45 µm ; il est ensuite broyé dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

2.2.2. Extraction de l'ADN

2.2.2.1. Principe

De nombreux protocoles d'extraction de l'ADN utilisant comme détergent le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ou le CTAB (Cetyl Triméthyle Ammonium Bromide) sont préconisés. Ces protocoles incluent des étapes de lyse cellulaire, des éliminations des débris cellulaires par des centrifugations et des précipitations des protéines et des polysaccharides. L'élimination des ARN et des protéines est rendue possible par addition de la RNase A et de la Protéinase K respectivement. L'ADN dissout dans la phase aqueuse est récupéré par solubilisation dans l'éthanol ou l'isopropanol sous forme d'une pelote puis lavé et resuspendu dans l'eau ultrapure.

2.2.2.2. Extraction

Le protocole d'extraction de l'ADN est basé sur la méthode publiée par Lee *et al.* (2006). A environ 100 mg de mycélium broyé dans l'azote liquide et placé dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, sont additionnés 800 µl de solution de lyse (100 mM Tris HCl pH8, 20 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% SDS). Par la suite, 10 µl de Protéinase K (20 mg/ml) sont ajoutés, le tout est incubé 20 min à 60°C. Un volume de 800 µl de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25/24/1, v/v/v) sont ajoutés. Les tubes sont mélangés par inversion jusqu'à l'obtention d'une émulsion. On procède à une centrifugation pendant 5 min à 13000 rpm, puis on récupère la phase supérieure (aqueuse) avant de la transférer dans de nouveaux tubes Eppendorf. Après une extraction au chloroforme/alcool isoamylique (24:1) en mélangeant par inversion comme précédemment, le mélange est centrifugé à 13000 rpm pendant 10 min à 4°C et la phase supérieure est récupérée. En fonction du volume obtenu, on ajoute du 2-propanol (0,7 v) refroidi pour précipiter l'ADN. On centrifuge 10 min à 13000 rpm et on élimine le surnageant. Le culot est rincé avec 50 µl d'éthanol à 70 % pour enlever les sels. On centrifuge de nouveau 5 min à 13000 rpm et on élimine le surnageant. Après séchage par centrifugation et évaporation sous vide au « speedvac concentrator », le culot est resuspendu dans 50 µl d'eau ultra pure stérile. Pour éliminer les ARN, 5 µl de la RNase (20 mg/ml) sont ajoutés. La présence et la pureté de l'ADN sont vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%. Le dosage de l'ADN est effectué par mesure de la densité optique (DO) au spectrophotomètre.

2.2.3. Dosage de l'ADN

La pureté et la quantité d'ADN en solution sont déterminées en faisant un spectre d'absorbance en U.V. entre 220 et 320 nm. Le maximum d'absorption de la molécule d'ADN se situe entre 258 et 260 nm. On calcule la concentration en ADN de l'échantillon en considérant qu'une unité d'absorbance équivaut à 50 µg/ml (1 unité de DO 260 nm = 50 µg/ml d'ADN).

Un volume de 4 µl d'ADN à doser est ajouté à 800 µl d'eau ultrapure (1/200). Le dosage au spectrophotomètre (Philips PU 8600) se fait dans une cuve en quartz à deux longueurs d'ondes :

- 260 nm, longueur d'onde d'absorption des acides nucléiques ;
- 280 nm, longueur d'onde d'absorption des protéines.

La quantité d'ADN est donnée par la formule suivante :

$$[\text{ADN}] = \text{DO}_{260 \text{ nm}} \times 50 \times \text{Facteur de dilution (ici, 200)}.$$

La pureté des échantillons est donnée par le rapport : $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$. Un rapport inférieur à 1,6 indique une contamination par des protéines et un rapport supérieur à 1,9 indique une contamination par des ARN.

2.2.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les molécules d'acides nucléiques sont séparées par électrophorèse sur gel d'agarose sous l'action d'un champ électrique. La séparation est fonction de la taille, de la qualité des acides nucléiques, de la concentration du gel d'agarose, du voltage et de la force ionique du tampon. La détection des bandes d'acides nucléiques après migration est rendue possible grâce à l'éthidium additionné en petite quantité dans le gel sous forme de bromide d'éthidium (BET). Celui-ci est un agent mutagène et hautement cancérigène, qui, une fois incorporé dans les structures des fragments d'ADN en migration, permet de visualiser les bandes par sa fluorescence sous U.V. (254 nm).

2.2.5. Préparation du gel migration

Le tampon servant à la migration et à la préparation du gel est le TAE simple concentré (1x) : Tris-Acétate-EDTA (acide Ethylène Diamine-Tétra-Acétique). Les sels contenus dans ce tampon permettent la conduction du champ électrique dans la cuve d'électrophorèse horizontale. L'agarose est utilisé à 0,8% (0,48 g dans 60 ml de TAE 1X). Après dissolution complète par chauffage au micro-onde suivi d'un léger refroidissement, 2 µl de BET (0,5 µg/ml) sont ajoutés à l'agarose. Celui-ci est versé, sans faire de bulles, dans la cuve à électrophorèse, après avoir placé un peigne qui donne la forme des puits de dépôt de l'ADN.

2.2.6. Amplification de l'ADN par la PCR : Polymérase Chain Reaction (PCR)

2.2.6.1. Principe

La PCR est une technique hautement sensible et spécifique qui permet une amplification de façon exponentielle de l'ADN *in vitro* (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986). Les 3 principales étapes de cette technique sont:

- dénaturation des brins d'ADN à une température de 94°C;
- hybridation des amorces à une température de 52°C;
- élongation à 72°C.

Les trois étapes d'un cycle de PCR se déroulent à des températures précises dans un thermocycleur (Robocycler gradient 96 Stratagene). Le thermocycleur est un système automatique, programmable qui permet le passage d'une température à l'autre et la répétition du cycle.

2.2.6.2. Protocole

La méthode utilisée est celle décrite par White *et al.* (1990). Pour amplifier la région ITS1-5.8S-ITS2 de l'ADNr, nous avons utilisé les amorces suivantes:

- Amorces 1: ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG3').
- Amorces 2: ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC3').

Pour l'amplification des régions IGS, les amorces suivantes ont été utilisées:

- Amorces 3 : IGS-F (5' AAGGAATTCAGGAATTCTCAATTG3').

- Amorces 4 : IGS-R2 (5' GTCCACCGGCAAATCGCCGTGCG3').

Un kit invitrogen est utilisé pour la préparation du milieu réactionnel. Ce kit est composé d'une enzyme, la *Taq* DNA polymérase, d'un tampon (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 9) et du MgCl₂.

Le mélange réactionnel est composé de:

- amorce 1 (50 μM)1 μl.
- amorce 2 (50 μM)1 μl.
- dNTP (10 mM chacun)1 μl.
- MgCl₂ (25mM) 1,5 μl.
- Tampon 10 X PCR.....5 μl.
- *Taq* DNA polymérase 5U/μl.....0,5 unités.
- ADN.....~ 200 ng.
- H₂O stérile.....qsp 50 μl.

L'amplification a été réalisée dans les conditions suivantes :

- Dénaturation des brins d'ADN: 94°C pendant 4 min.
- 35 cycles :
- Dénaturation 60 secondes à 94°C.
- Hybridation 60 secondes à 55°C.
- Elongation 120 secondes à 72°C.
- Elongation finale 10 min à 72°C.

2.2.7. Visualisation des produits PCR sur gel d'agarose

Le produit PCR (7 μl) est additionné de 5 μl de tampon de charge (Blue/Orange Loading Dye, 6X). Le mélange est déposé dans le puits du gel d'agarose à 0,8% et mis à migrer à 100 volts pendant 20 min dans du tampon TAE 1X. Un marqueur de taille (1Kb DNA Ladder, Promega) est déposé au milieu ou à l'extrémité du gel. Les profils sont visualisés sous U.V. (254 nm).

2.2.8. Purification des produits PCR

Les produits PCR ont été purifiés avec le kit JETQUICK PCR Spin (MP Biomedicals et Qbiogene, Illkirch, France) selon le protocole décrit dans la notice accompagnant le kit. Les étapes de purification des produits PCR sont les suivantes:

- ajouter 200 μL de la solution H1, contenant du chlorure de guanidine et d'isopropanol, à 50 μl du produit PCR;
- placer la colonne dans des tubes récepteurs (fournis par JET QUICK);
- charger la colonne avec le produit PCR;

- centrifuger 1 min à 13000 rpm;
- jeter le liquide;
- ajouter 500 µl de la solution tampon concentré (H2), composée de NaCl, EDTA et Tris-HCl (reconstituée dans 30 ml d'éthanol à 96%);
- centrifuger 1 min à 13000 (2 fois);
- jeter le liquide;
- placer la colonne dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml;
- ajouter 50 µl d'H₂O;
- centrifuger à 13000 rpm;
- récupérer le surnageant (ADN purifié).

2.2.9. Analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PCR-RFLP)

Pour l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction, nous avons utilisé les amorces des espaceurs intergéniques (IGS) (Edel, 1998; Pelant, 2002).

L'extraction de l'ADN et l'amplification par PCR des régions IGS ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour l'amplification des régions ITS citées précédemment. L'endonucléase BglII a été utilisée pour la digestion enzymatique (BglII: 5'A/GATCT3'). L'hydrolyse enzymatique par Bgl II présente les extrémités 5' sortantes suivantes:

5' GATCT-----A 3' et 3' A-----TCTAG 5'.

Les extrémités compatibles avec les fragments hydrolysés par BglII sont:

5' GATCC-----G 3' & 3' G-----CCTAG 5'.

Le mélange réactionnel est composé de:

- Tampon (10x) (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 9) ...5 µl.
- Produit PCR.....10 µl.
- Enzyme BglII (10 U/µl).....2 µl.
- Eau.....33 µl.

La digestion enzymatique a lieu au bain Marie à 37 °C pendant 3 h. La migration des produits de digestion (15 µl de chaque produit) est réalisée sur gel d'agarose (1,5%) à 50 volts pendant 45 min.

2.2.10. Séquençage de la région ITS1-5.8S-ITS2 amplifiées

Le séquençage des amplicons correspondant aux régions ITS1-5.8S-ITS2 de l'ADNr des souches d'*Aspergillus* section *Flavi* a été réalisé par la société Millegen, Prologue Biotech (Labège, Toulouse, France). Par la suite, l'identification des séquences est obtenue en deux étapes suivantes:

- Les séquences sont soumises, une à une, au programme BLAST (Zhang et Madden, 1997) qui compare chaque séquence à toutes celles présentes dans la base de données GenBank et va renvoyer le ou les noms des espèces les plus probables. Une évaluation de la pertinence des résultats proposés par BLAST est réalisée par l'intermédiaire du programme et de la base de données développée par National Center for Biotechnology Information « NCBI ».

- Un multi-alignement des séquences avec les séquences caractéristiques des souches-types d'*Aspergillus* section *Flavi* et un arbre phylogénétique sont enfin réalisés grâce au logiciel MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007). Les analyses phylogénétiques sont effectuées par les méthodes de calcul des matrices de distances d'évolution de Kimura (1980) et en utilisant les méthodes de Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987) pour les algorithmes de construction des topologies des arbres phylogénétiques. La méthode de validation statistique des liens phylogénétiques établis est le Bootstrap (Felsenstein, 1981).

3. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines

Les aflatoxines possèdent une fluorescence propre qui permet de les détecter généralement dans l'U.V. lointain (365 nm). A cette longueur d'onde, elles sont fluorescentes: couleur bleue pour les aflatoxines B, verte pour les aflatoxines G et bleu-mauve pour l'aflatoxine M1. Le screening des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* producteurs d'aflatoxines est réalisé par détection de la fluorescence sur milieu de culture à base de noix de coco, selon la technique décrite par Davis *et al.* (1987) et Fente *et al.* (2001) et par chromatographie sur couche mince (CCM) selon Calvo *et al.* (2004).

3.1. Détection de la fluorescence sur milieu de culture

Les souches fongiques sont ensemencées par point central (1 souche par boîte) sur milieu gélosé à base d'extrait de noix de coco déchiqueté (CAM), favorable à la production d'aflatoxines (Fente *et al.*, 2001), additionné de 0,3% de β -cyclodextrine qui permet d'améliorer nettement l'intensité de la fluorescence. La β -cyclodextrine et ses dérivés méthylés ont été utilisés par de nombreux auteurs (Franco *et al.*, 1998; Chiavaro *et al.*, 2001; Criseo *et al.*, 2001; Fente *et al.*, 2001 et Rojas *et al.*, 2005) pour la détection des souches aflatoxinogènes. Dans le milieu CAM, les aflatoxines, combinées aux matières grasses de la noix de coco, donnent une fluorescence visible sous lumière U.V. (365 nm) surtout sur le revers de la colonie (Davis *et al.*, 1987). En effet, après 48 à 72 h d'incubation à 28°C, les isolats producteurs d'aflatoxines B et G développent autour de la colonie une fluorescence bleue et verte respectivement, visibles sous la lumière U.V. (365 nm) et un revers de la colonie jaune orangé visible à la lumière du jour.

3.2. Extraction des aflatoxines du milieu de culture

En vue d'une confirmation de la production des aflatoxines par CCM et par HPLC, les cultures des isolats sur milieu CAM ont subi une extraction au chloroforme selon la méthode décrite par Calvo *et al.* (2004). Quatre rondelles de 16 mm de diamètre (environ 2 g) de milieu colonisé par le mycélium sont découpées, pesées puis écrasées à l'aide d'une spatule. Les aflatoxines sont extraites avec 15 ml de chloroforme additionnés en 3 reprises (3 x 5 ml) et agitation durant 3 min par extraction. Les extraits chloroformiques sont réunis dans un même Erlenmeyer puis filtrés avec du papier Whatman n° 1. Le filtrat est ensuite évaporé à sec au rotavapeur à une température de 37°C en prenant soin de protéger l'extrait de la lumière. L'extrait est ensuite repris dans 0,5 ml de méthanol (CH₃OH) pour HPLC, puis filtré à l'aide d'un filtre en polytrifluoroéthylène (PTFE 0,45 µm) adaptable au bout d'une seringue.

3.3. Détection et confirmation de la production d'aflatoxines par CCM

La méthode utilisée pour la détection des aflatoxines par CCM est celle décrite par l'A.O.A.C (Official Methods of Analysis) (2000). Des plaques (20 x 20 cm, 0,25 mm d'épaisseur) de gel de silice-60 254F (Merck) ont ainsi été utilisées. Le solvant de développement est le benzène-acide acétique glacial (95:5 v/v). Des fractions de 15 à 25 µl sont appliquées soigneusement sous une lumière tamisée en évitant d'abîmer la surface de la plaque. Ces précautions sont importantes pour l'obtention d'une bonne qualité de séparation des aflatoxines. Un volume de 15 µl d'une solution standard de 1 µg/ml d'aflatoxine B1 est appliqué en même temps que les extraits à analyser. Un extrait d'aflatoxine G, obtenu à partir d'*A. parasiticus* CBS 100926 (après extraction selon la méthode décrite ci-dessus et séparation sur CCM) a été utilisé comme témoin. Le développement des chromatogrammes est effectué dans une cuve standard (25 x 25 x 10 cm) préalablement saturée avec le système de solvant de développement. Après migration, les plaques sont retirées et séchées. Les aflatoxines sont détectées en plaçant les plaques sous lumière U.V. (365 nm). Les aflatoxines B et G apparaissent sous forme de tache bleue et verte respectivement. Une comparaison des rapports frontaux (Rf) des extraits avec ceux des standards et de l'intensité de la fluorescence des taches permet de confirmer la présence d'aflatoxines et d'apprécier les quantités produites.

3. 4. Confirmation et quantification des aflatoxines par HPLC

Une confirmation et une quantification des aflatoxines par HPLC munie d'une cellule électrochimique de dérivation au brome « KOBRA Cell » a été également réalisée.

Lors de la première utilisation, la colonne chromatographique est lavée toute une nuit par le passage d'un mélange d'acétonitrile-eau (85/15, v/v) à un débit de 0,20 ml/min. Elle est ensuite conditionnée pendant 45 min par passage de la phase mobile utilisée pour l'analyse à un débit de 0,5 ml.

Les aflatoxines sont analysées sur un chromatographe de marque Shimadzu LC-10 (Kyoto, Japon) dont les caractéristiques sont décrites en annexe III. La phase mobile est composée de méthanol-acétonitrile-eau (20:20:60 v/v). Pour la dérivation, à un litre de phase mobile, 119 mg de bromure de potassium et 350 µl d'acide nitrique 4M sont ajoutés (selon le manuel KORA Cell®). Le débit est réglé à 0,5 ml/min. Un volume de 20 µl d'échantillon est injecté manuellement à l'aide d'une microsiringue. L'analyse est réalisée en condition isocratique. La pression est alors de 28-30 mPa et les temps de rétention des aflatoxines B1, B2, G1 et G2 sont respectivement 30, 24, 22,5 et 21 min. Des solutions standards de l'aflatoxine B1 pure de concentrations connues sont injectées intercalées parmi la série d'échantillons. Un extrait de l'aflatoxine G obtenu à partir d'*A. parasiticus* a été utilisé comme témoin pour la détection de cette mycotoxine dans les échantillons. La détection est réalisée en réglant l'onde d'excitation à 362 nm et des filtres d'émission à 425 nm pour B1 et B2 et à 455 nm pour G1 et G2 (optima pour les aflatoxines). Des lavages au méthanol de qualité HPLC sont effectués après chaque injection afin d'éliminer les traces d'aflatoxines.

L'AFB1 et l'AFG1 sont confirmées par leur transformation dans la cellule KOBRA Cell®, placée en post-colonne, en leur dérivé 9,10-dibromé, qui est détecté par spectrofluorimétrie. La cellule de KOBRA Cell® est connectée au système HPLC entre la colonne HPLC et le détecteur de fluorescence. Les 4 aflatoxines séparées et l'agent précurseur de dérivation (bromure de potassium) entrent dans le KOBRA Cell®, où va se dérouler la réaction électrochimique générant le brome. Les aflatoxines et le brome ressortent de la cellule avant que la réaction de dérivation n'ait lieu. Celle-ci aura lieu dans le tube de connexion avant l'entrée dans le détecteur de fluorescence (Figure 17). Cette longueur de tube entre la sortie de la cellule et le détecteur est donc très importante et doit être suffisante pour permettre la réaction de dérivation au brome qui dure 4 secondes (KOBRA Cell, 2005). L'enregistrement et l'analyse des chromatogrammes sont effectués par un logiciel adapté (Normasoft).

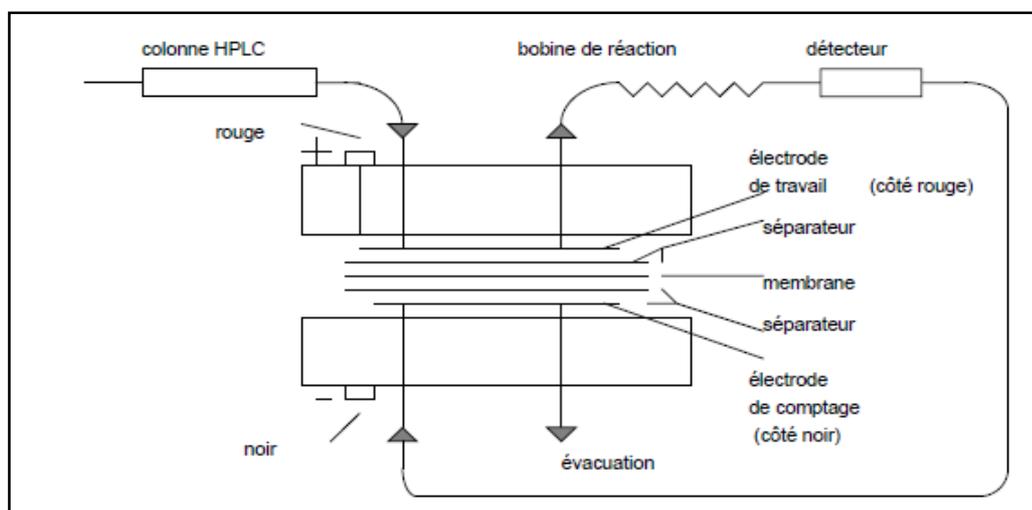


Figure 17. Schéma des connexions de la KOBRA Cell à l'HPLC.

4. Production et détection d'acide cyclopiazonique

4.1. Production de l'acide cyclopiazonique

La production de l'acide cyclopiazonique (CPA) est réalisée sur milieu CYA selon la méthode décrite par Pildain *et al.* (2004). Après 10 jours d'incubation sur milieu CYA à 25°C, 2 g de milieu colonisé par le mycélium sont découpés à l'aide d'un emporte pièce stérile. L'extraction du CPA est réalisée en ajoutant 3 x 5 ml de chloroforme (Dorner, 1983). Après évaporation, les extraits sont repris dans 0,5 ml de méthanol et filtrés à l'aide d'un filtre PVDF (Millipore) de 0,45 µm.

4.2. Détection de l'acide cyclopiazonique par CCM

Des plaques de gel de silice de type G60 (20 x 20 cm, 0,25 mm d'épaisseur; Merck 5721; Allemagne), ont été utilisées. Afin d'évaluer la limite de détection, une série de concentration de 10, 25, 50 et 100 µg/ml de CPA dans du méthanol est préparée et un volume de 20 µl de chaque concentration est spoté sur la plaque. Après avoir déterminé la limite de détection, 20 µl d'un standard et 20 µl de chaque extrait, repris dans 0,5 ml du méthanol, sont spotés sur les plaques préalablement imprégnées dans une solution d'acide oxalique à 2% dans du méthanol puis séchés. Le système de solvant de développement utilisé est l'acétate d'éthyle/2-propanol/hydroxyde d'ammonium (40:30:20) (Fernandez Pinto *et al.*, 2001). Après migration, le CPA est visualisé sous la lumière du jour après pulvérisation des plaques par le réactif d'Ehrlich (1 g de 4-diméthyle aminobenzaldéhyde dans 75 ml d'éthanol et 25 ml d'HCl concentré). Le CPA est détecté sous forme de tache violette avec un même $R_f = 0,6$. La limite de détection est de 1µg/g de milieu de culture.

5. Etude du pouvoir producteur d'ochratoxine A

5.1. Culture et extraction

Le pouvoir producteur de l'OTA par les isolats appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* a été déterminé par HPLC selon la méthode décrite par Bragulat *et al.* (2001). La méthode consiste à cultiver les isolats sur milieu gélosé CYA, favorable à la production d'OTA, pendant 7 jours à 25°C. Trois rondelles (10 mm de diamètre) de milieu colonisé par le mycélium sont découpées à l'aide d'un emporte-pièce du centre vers la périphérie de la boîte de Pétri (60 mm de diamètre). Les carottes découpées sont pesées puis introduites dans des tubes Eppendorf de 2 ml. L'extraction de l'OTA est réalisée par addition de 1 ml de méthanol tout en écrasant les morceaux de gélose afin de faciliter l'extraction. Après incubation pendant une heure à température ambiante, le mélange est centrifugé pendant 15 min à 13000 g puis le surnageant est filtré à l'aide d'un filtre PVDF (Millipore) de 0,45 µm. Le filtrat est récupéré dans un flacon (vial) HPLC et conservé à + 4°C.

5.2. Détection et quantification par HPLC

L'appareil HPLC utilisé (Biotek, Milan, Italie) permet une détection par fluorescence (λ ex: 332 nm; λ em: 466 nm) et par U.V. (détecteur à barrettes de diode). Un logiciel (Kroma 3000) permet de piloter l'ensemble du système et d'assurer l'acquisition des données. La colonne analytique utilisée est de type C18 (Zorbax 5 μ m, 150 \times 4,6 mm) avec une précolonne de 10 x 4 mm. La température de la colonne est de 30°C. La phase mobile est composée d'acétonitrile-eau-acide acétique (57:41:2) et le débit est de 1 ml/min. Un volume de 80 μ l de chaque échantillon est injecté grâce à un injecteur automatique. Une gamme de solutions standards d'OTA est injectée de façon intercalée entre 10 injections. Ceci permet de suivre le temps de rétention de l'OTA qui peut être légèrement décalé si les d'extraits injectés contiennent quelques impuretés. En effet, ceux-ci entraînent une augmentation de la pression et donc un décalage du temps de rétention du standard. La concentration est déterminée par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 330$ nm. L'OTA de l'échantillon est identifiée par comparaison avec l'OTA standard, du temps de rétention (~ 7 min) et aussi du spectre U.V. qui est donné grâce au détecteur à barrettes de diode. La concentration en OTA est calculée à l'aide d'une courbe étalon préalablement établie avec des solutions d'OTA de concentrations connues. Le seuil limite de détection est de 0,020 ng/g de milieu.

6. Extraction des aflatoxines et de l'ochratoxine A à partir des échantillons de blé

6.1. Principe général

Dans les conditions acides, les mycotoxines sont extraites à partir de matrices de nature différentes. L'acidification et la force ionique de la solution d'extraction permettent de rompre en partie les liaisons des toxines aux constituants de la matrice et favorisent ainsi leur extraction. La purification de l'extrait est réalisée par partage de phase: en fonction de leur état d'ionisation, les mycotoxines seront solubles, soit dans la phase aqueuse, soit dans la phase organique.

6.2. Extraction à partir du blé

La méthode d'extraction des aflatoxines et de l'OTA utilisée est celle décrite par Molinié *et al.* (2005) et El Adlouni *et al.* (2006). Le protocole d'extraction est illustré dans la figure 18. Vingt grammes de blé finement broyés sont additionnés à 20 ml d'une solution de 4% de chlorure de potassium (KCl) acidifié à pH 1,5 avec de l'acide sulfurique concentré. Un volume de 180 ml du solvant d'extraction acétonitrile/eau (9:1) est ajouté au mélange préalablement homogénéisé. Le solvant d'extraction et le blé, disposés dans un Erlenmeyer de 500 ml, sont mis à agiter sur un agitateur rotatif pendant 20 min. L'extrait est filtré sous vide sur papier filtre Whatman n° 4.

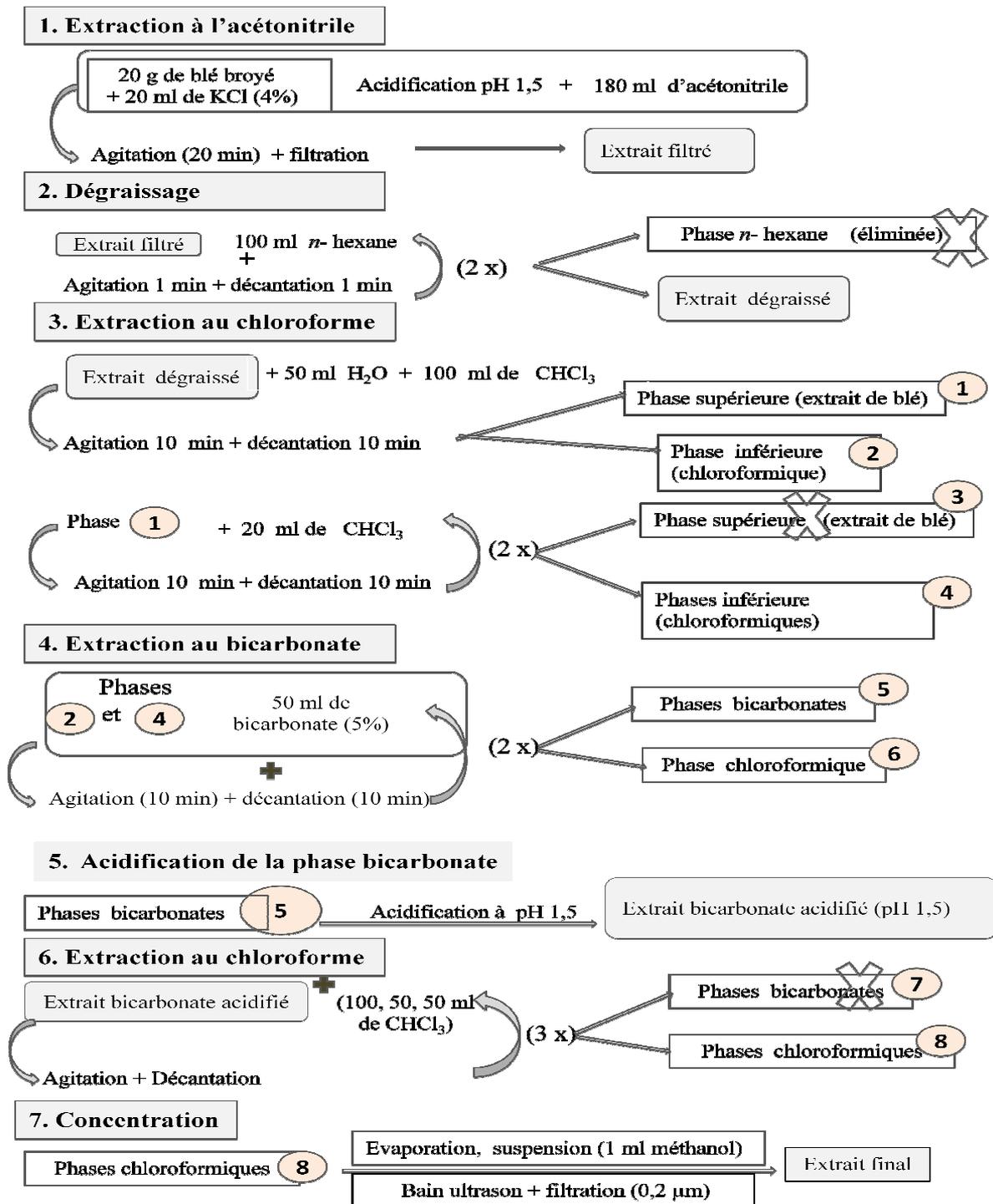


Figure 18. Protocole d'extraction des aflatoxines et de l'OTA d'un échantillon de blé.

6.3. Purification de l'extrait

Le filtrat est dégraissé par addition de 2 x 100 ml de *n*-hexane et agitation pendant une minute. Après décantation, la phase supérieure (*n*-hexane) est éliminée et la phase inférieure est récupérée dans un Erlenmeyer de 250 ml. Après addition de 50 ml d'eau ultrapure, la phase inférieure (acétonitrile/eau) est extraite par 100 ml de chloroforme. Pour cela, le mélange acétonitrile/eau et chloroforme est placé 10 min sur l'agitateur rotatif. Après agitation, puis une décantation de 10 min, la phase chloroformique inférieure est récupérée dans un Erlenmeyer. La phase acétonitrile/eau supérieure est à nouveau extraite 2 fois par addition de 20 ml de chloroforme. Après 10 min d'agitation et 10 min de décantation, les phases chloroformiques sont récupérées.

Les extraits chloroformiques, réunis dans un même Erlenmeyer, sont extraits deux fois par 50 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 5%. Après une agitation de 10 min et une décantation de 10 min, la phase supérieure (bicarbonate) est placée dans un Erlenmeyer et la phase inférieure (chloroformique) est de nouveau extraite par 50 ml de bicarbonate. Les deux extraits au bicarbonate, réunis dans un même Erlenmeyer, sont acidifiés jusqu'à pH 1,5 par ajout d'acide chlorhydrique (HCl) concentré. Cet extrait au bicarbonate acidifié est extrait à son tour à trois reprises par du chloroforme (volumes de 100, 50 et 50 ml), après agitation (10, 5 et 5 min) et décantation (10 min pour chaque étape d'extraction). L'extrait chloroformique inférieur est récupéré dans un Erlenmeyer. L'ensemble des extraits chloroformiques réunis sont évaporés (sous vide d'air) dans des ballons à fond conique de 50 ml plongés dans un bain marie à 40°C. Quand le volume du chloroforme est réduit à environ 5 ml, ce solvant est transféré dans un tube à hémolyse pour être évaporé sous flux d'azote. L'extrait sec est remis en suspension dans 1ml de méthanol et placé dans un bain à ultrasons pendant une minute puis filtré sur un filtre de 0,2 µm (Sartorius AG, Goettingen, Allemagne) préalablement conditionné avec du méthanol. Le filtre est rincé avec 500 µl de méthanol. Le méthanol filtré est placé dans un tube à hémolyse et le filtrat est séché au bain marie, sous flux d'azote. Une fois sec, l'extrait (remis en suspension dans 500 µl de méthanol) est placé dans un flacon en verre bien fermé et conservé à + 4°C avant d'être analysé par HPLC.

6.4. Préparation des solutions standards

Les solutions standards de mycotoxines, AFB1 et OTA, sont préparées par solubilisation d'un milligramme de chaque mycotoxine dans un millilitre de méthanol. La concentration de la solution standard de l'AFB1 est déterminée par la mesure de l'absorbance en U.V. à 362 nm ($\epsilon = 21800/\text{mol}/\text{cm}$) et celle de l'OTA à 333 nm ($\epsilon = 5440/\text{mol}/\text{cm}$).

6.5. Détermination du taux de rendement d'extraction de l'OTA

Une gamme de solutions standards de concentrations allant de 10 à 100 ng/ml est préparée à partir d'une solution de 10 µg/ml de l'OTA dans du méthanol. Le taux de rendement d'extraction a été calculé en contaminant des lots de 50 g d'un broyat de blé non contaminé à raison de 5, 10, 20 et

50 µg/kg. Après évaporation du méthanol durant une nuit, l'OTA est extraite selon la méthode décrite plus haut. Le pourcentage du rendement d'extraction est ensuite déterminé et est pris en compte pour le calcul des teneurs en OTA dans les échantillons analysés.

6.6. Confirmation de la présence des aflatoxines et de l'OTA

La présence des aflatoxines B et G dans les extraits issus des cultures des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* et des échantillons de blé est confirmée par leur transformation dans le KOBRA cell[®], placée en post-colonne, en leur dérivé 9,10-dibromé, qui est détecté par spectrofluorimétrie (voir 3.4 page 82).

La confirmation de la présence de l'OTA dans certains échantillons est réalisée par hydrolyse de l'OTA en OT α (l'OTA ayant perdu la phénylalanine) et détection par HPLC, selon la technique suivante:

Un volume connu de l'extrait purifié d'échantillon est évaporé à sec. Le résidu est dissous dans 975 µl d'une solution de tampon à pH 7,5 (0,04M Tris-HCl, 1M NaCl). Un volume de 25 µl de la carboxypeptidase (100 U/ml H₂O) est ajouté et le mélange est incubé à température ambiante durant une journée. La disparition du pic spécifique de l'OTA simultanément à l'apparition spécifique du pic d'OT α confirme la présence de l'OTA.

7. Analyse des aflatoxines dans les extraits de blé et dérivés par HPLC

L'analyse des aflatoxines dans les extraits de blé et dérivés par HPLC a été réalisée par la même méthode et dans les mêmes conditions décrites précédemment (Paragraphe 3.4, pages 75 et 76).

8. Analyse de l'ochratoxine A dans les échantillons de blé par HPLC

L'analyse de l'OTA dans les échantillons de blé a été réalisée selon la méthode décrite précédemment (voir 5.2.) sur la même chaîne HPLC (BIO-TEK, Milan, Italie). La phase mobile est composée d'acétonitrile-eau-acide acétique (41:57:2, v/v). Une colonne C18 (Prontosil 5 µm, 150 × 4,6 mm) a été utilisée. Dans ces conditions le temps de rétention de l'OTA est de 9 min.

9. Etude de l'influence de la température et de l'activité de l'eau sur la croissance et la production de l'aflatoxine B1 d'une souche d'*Aspergillus flavus*

9.1. Souche et milieux de culture utilisés

Une souche AF92 d'*A. flavus*, isolée à partir d'un échantillon de blé tendre, variété Hidhab, de la récolte de 2006 et provenant d'une parcelle de blé de Rouiba (Alger), a été utilisée. Cette souche, très fortement productrice de l'aflatoxine B1, a été identifiée selon les caractères morphologique, chimiotypique et moléculaire (séquençage de la région ITS1-5.8S-ITS2 de l'ADNr).

Deux milieux de culture ont été utilisés dans cette expérimentation. Le milieu CYA et le milieu à base d'extrait de blé tendre, variété Hidhab. Ce dernier provient de la récolte de 2006 prélevé d'une parcelle de blé de la région de Rouiba (Alger). La teneur en eau initiale du broyat séché était de 12% (a_w : 0,56). Le milieu de culture à base de blé a été préparé selon la méthode de Ramos *et al.* (1998). Celle-ci consiste à faire bouillir 30 g de blé finement broyé dans un litre d'eau distillée pendant 30 min. Le mélange est filtré à l'aide de 4 couches de tissu de mousseline et le filtrat est ensuite additionné de 15 g d'agar et ajusté à un litre par l'eau distillée.

Quatre valeurs d'activité de l'eau et 4 températures ont été testées. Pour obtenir les valeurs d'activité de l'eau de 0,85; 0,90; 0,95 et 0,99, des quantités glycérol de 469, 352, 204 et 64 g/l ont été ajoutés respectivement (Pardo *et al.*, 2005). Le milieu est autoclavé à 120°C pendant 20 min, puis distribué dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre à raison de 20 ml/boîte.

9.2. Inoculation et incubation

La suspension de spores de la souche d'*A. flavus* est obtenue à partir d'une culture sur milieu PDA incubée pendant 7 jours à 28°C. Les spores sont mises en suspension dans 10 ml d'eau distillée stérile contenant 0,005% de tween 80. Une série de dilution est réalisée à partir de la suspension mère et le nombre de spores pour chaque dilution est ensuite déterminé par comptage sur la cellule de Thoma. Les boîtes de Pétri contenant les milieux de cultures à différentes activités de l'eau sont ensemencées en déposant au centre de la boîte 10 μ l de la suspension fongique contenant environ 1×10^6 spores/ml. Les milieux sont incubés aux températures de 20, 25, 30 et 37°C. Pour chaque température correspondent 4 valeurs d'activité de l'eau (a_w) (0,85; 0,90; 0,95 et 0,99). Trois répétitions ont été réalisées par traitement. Les boîtes ayant les mêmes a_w sont placées dans une boîte en polyéthylène couverte de manière à minimiser l'évaporation d'eau. Afin de maintenir le taux d'humidité des bacs d'eau sont placés dans les incubateurs. L'expérimentation a duré 3 semaines.

9.3. Détermination de la vitesse de croissance mycélienne

La mesure de la croissance radiale est réalisée toutes les 24 h durant 21 jours. Pour chaque boîte de Pétri, deux mesures du diamètre de la colonie ont été prises sur deux angles perpendiculaires. La croissance journalière (vitesse de croissance) est exprimée en millimètres par jour. Les comparaisons des valeurs moyennes observées pour l'influence de l'activité de l'eau et de la température sur la vitesse de croissance ont été réalisées en effectuant des analyses de la variance à un critère (ANOVA 1). La statistique du test (F) a été comparée à la valeur théorique en utilisant le seuil de signification $\alpha = 0,05$.

9.4. Détermination du pouvoir de production d'AFB1

Le suivi de la production d'AFB1 par l'isolat d'*A. flavus* dans les différents traitements a été effectué après 7, 15 et 21 jours d'incubation. La méthode utilisée pour l'extraction des aflatoxines est celle de Bragulat *et al.* (2001) décrite précédemment (paragraphe 7, page 78). Le dosage est effectué par le système HPLC muni d'une cellule de dérivation au brome (KOBRA Cell[®]), selon la méthode décrite (Paragraphe 3.4, pages 75 et 76).

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Analyse de la flore fongique des échantillons de blé et des produits dérivés

Dans cette étude un total de 108 échantillons de blé et dérivés a été analysé. Dans un premier temps nous avons prélevé 85 échantillons de la récolte de 2004, composés de blé non stocké, de blé stocké dans les silos et de blé transformé en semoule et en farine. L'objectif était d'analyser la flore fongique et de rechercher les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A dans la filière blé. En outre, nous avons prélevé 23 échantillons de blé de la récolte de 2006 collectés dans la Mitidja et les régions voisines et dans la région de Sétif. Ces 23 échantillons représentent différentes variétés de blé dur et de blé tendre prélevées dans différentes localités. Ce deuxième échantillonnage répond à un double objectif, celui de comparer les résultats de deux saisons (2004 et 2006) et celui d'évaluer la distribution des champignons toxigènes en fonction du climat, des variétés de blé et des localités.

1. Reconnaissance des genres et des espèces

1.1. Reconnaissance des genres

Les principaux genres fongiques identifiés au cours de cette étude sont *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Mucor*. Ils ont été identifiés selon les caractères macroscopiques et microscopiques. L'observation de la couleur et de la texture de la colonie, sur le milieu d'isolement (DRBC), ainsi que les structures micromorphologiques permet généralement de faire la distinction entre les principaux genres.

Le genre *Aspergillus*: les caractères morphologiques de ce genre ont déjà été décrits dans la partie bibliographique consacrée aux généralités sur les champignons producteurs des mycotoxines (Figure 6; page 34).

Le genre *Penicillium*: les colonies sont généralement de couleur bleu-vert. Les spores, extrêmement nombreuses, sont produites en chaînes par des phialides groupées en pinceau (d'où le nom de *Penicillium*). Entre le stipe et les phialides peuvent s'intercaler des cellules intermédiaires qui donnent lieu à des formes complexes. En général, on distingue les *Penicillium* monoverticillés dont les phialides sont portées directement sur le stipe, les biverticillés dont les phialides sont portées sur une rangée (verticille) de cellules intermédiaires (métules) et les terverticillés avec un troisième niveau de ramification. Ces caractères servent à la différenciation des groupes et des espèces. Les conidies sont disposées en de longues chaînes et sont globuleuses, elliptiques, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses, hyalines, grisâtres ou verdâtres.

Le genre *Fusarium*: les cultures de ce genre sont d'aspects et de couleurs variés. La reconnaissance du genre *Fusarium* est surtout basée sur l'observation des conidies de forme très

caractéristiques, les microconidies et les macroconidies portées par des phialides (Figure 19). Les espèces de *Fusarium* spp. isolées au cours de cette étude développent sur milieu PDA des colonies de couleur blanc-rosé, blanc-beige à mauve pâle et un revers brun jaune à brun pourpre. Les colonies sont floconneuses ou rases et d'aspect muqueux ou velouté selon les isolats. La plupart des isolats produisent des microconidies et des macroconidies et chez certains des chlamydospores ont été observées.

Le genre *Alternaria*: les cultures d'*Alternaria* se présentent sous forme de colonies grises à noirâtres et veloutées. A la loupe, on observe des chaînes ramifiées de spores allongées à pyriformes. Les conidiophores, foncées, sont simples ou ramifiés, produisant à leurs extrémités des chaînes de conidies. Ces dernières sont brunes, pluricellulaires, divisées par des cloisons transversales, longitudinales ou obliques, très caractéristiques (Figure 20).

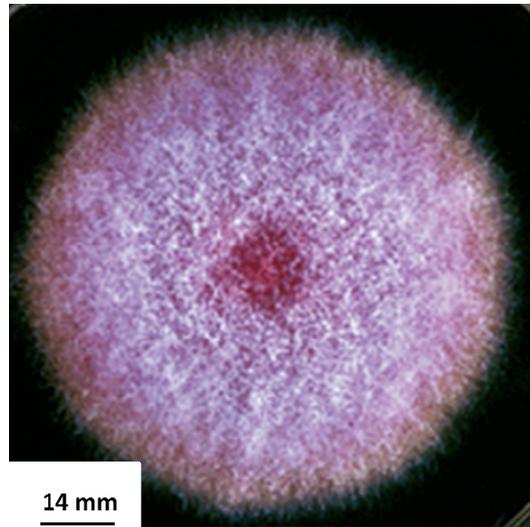
Le genre *Mucor*: il est caractérisé par des colonies à croissance très rapide. Le thalle aérien, de 2 à 20 mm de hauteur, est au début blanc, devenant brun gris en vieillissant. Ce genre se caractérise par la présence de sporangiophores longs ou courts, ramifiés ou non et portant des sporocystes arrondis à columelles elliptiques ou rondes (Figure 21).

1.2. Reconnaissance des espèces du genre *Aspergillus*

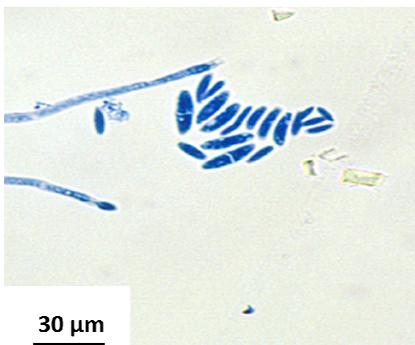
Au cours de cette étude nous avons identifié une dizaine d'espèces du genre *Aspergillus*. Le terme « espèce », employé ici, peut parfois désigner un groupe d'espèces appartenant à la même section. En effet, l'identification basée sur les caractères morphologiques ne suffit pas pour distinguer entre certaines espèces de la même section. Avant de présenter les résultats relatifs à la distribution des genres et des espèces au sein de la filière, nous donnons ci-après la liste des principales espèces ou les groupes d'espèces isolés et leurs caractères morphologiques: *A. flavus* (*Aspergillus* section *Flavi*), *A. niger* (*Aspergillus* section *Nigri*), *A. ochraceus* (*Aspergillus* section *Circumdati*), *A. versicolor* (*Aspergillus* section *Versicolores*), *A. terreus* (*Aspergillus* section *Terrei*), *A. carbonarius*, *A. fumigatus* (*Aspergillus* section *Fumigati*), *A. alliaceus* (forme anamorphe de *Petromyces alliaceus*), *A. candidus* (*Aspergillus* section *Candidi*) et *A. glaucus* (*Aspergillus* section *Aspergillus*). Les espèces non identifiées sont désignées par *Aspergillus* spp.

Les principaux caractères d'identification d'*Aspergillus flavus*, d'*A. ochraceus*, d'*A. carbonarius* et d'*A. niger* « aggregate » ont été décrits dans le chapitre consacré au genre *Aspergillus* (Figure 7, page 37; Figure 9, page 42 et Figure 10, page 45) Les caractéristiques des autres espèces identifiées dans cette étude (*A. alliaceus*, *A. candidus*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. tamarii*, *A. terreus* et *A. versicolor*) sont les suivantes:

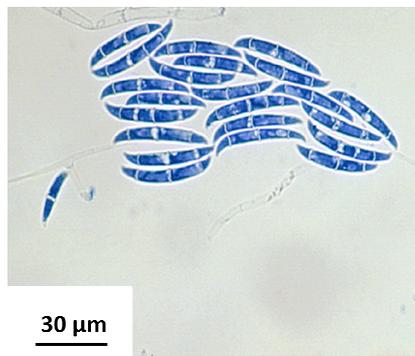
***A. candidus*:** colonies blanches, restreintes, denses et veloutées. Au microscope : têtes bisériées, vésicules rondes, stipes lisses, conidies sphériques lisses et sclérotés tardifs.



A: aspect macroscopique: colonie poussant sur milieu CYA.



Microconidies



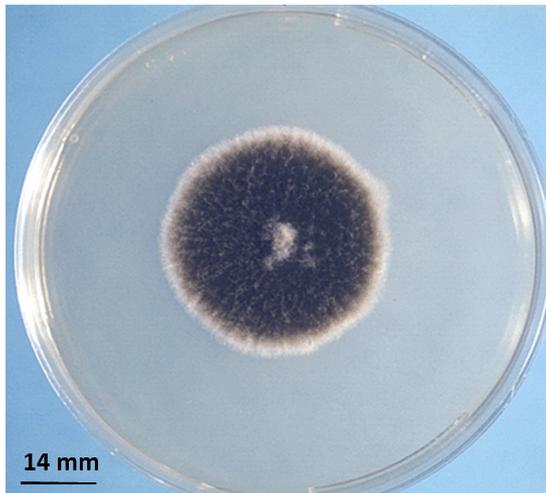
Macroconidies



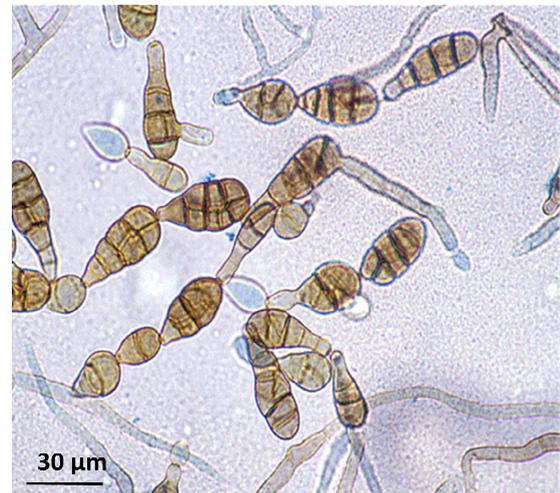
Chlamydospores

B: aspect microscopique

Figure 19. Aspects macroscopique et microscopique du genre *Fusarium*.

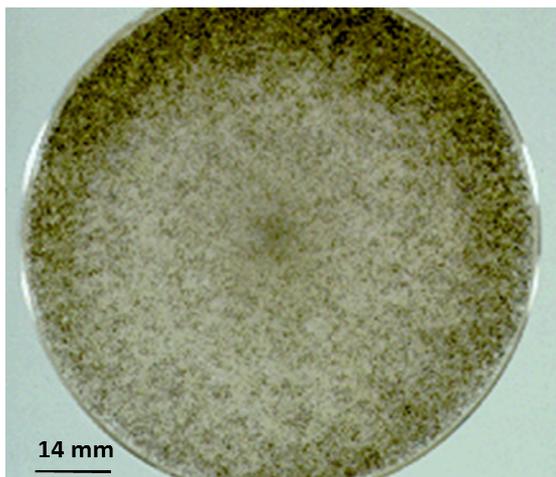


A: aspect macroscopique sur milieu CYA.



B: aspect microscopique.

Figure 20. Aspects macroscopique et microscopique du genre *Alternaria*.



A: aspect macroscopique sur milieu CYA.



B: aspect microscopique.

Figure 21. Aspects macroscopique et microscopique du genre *Mucor*.

A. fumigatus: colonies bleu-vert à turquoise, veloutées et à bordure blanche, avec un revers incolore à gris-vert pâle. Au microscope: têtes unisériées, vésicules piriformes allongées très caractéristiques avec des phialides portées sur la moitié supérieure et un stipe lisse. Cette espèce est thermotolérante (température optimale: 37-43°C).

A. terreus : colonie brun-beige à brun-orangé, avec têtes conidiennes bisériées en forme de longues colonnes.

A. versicolor: colonies jaune-vert assez peu étendues et denses. Au microscope: vésicules allongées, bisériées, stipes lisses, conidies rondes et rugueuses.

A. glaucus: colonies vertes, cleistothèces jaunes et généralement présents, têtes unisériées avec des conidies rugueuses de grandes tailles, mesurant jusqu'à 8 µm.

A. parasiticus: colonies vert jaune sombres compactes et très caractéristiques. Au microscope: têtes majoritairement unisériées caractérisées par des vésicules sphériques (de 30-35 µm de diamètre), plus petites que celles d'*A. flavus* recouvertes au trois quart, donnant des phialides portant des conidies sphériques de 4-6µm de diamètre.

La morphologie des colonies d'*A. flavus* et d'*A. parasiticus* (utilisées comme souches de références) et des principales espèces isolées dans cette étude (*A. fumigatus*, *A. tamarisii*, *A. terreus* et *A. versicolor*) sont illustrées dans la figure 22.

1.3. Reconnaissance de l'espèce de *Penicillium verrucosum*

Dans cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'espèce *P. verrucosum* productrice d'OTA. Ses caractéristiques macro et micromorphologiques sont présentées dans la figure 23. Sur milieu CYA, les colonies sont de couleur bleu-gris, avec présence de nombreux sillons radiaux, peu profonds, à la périphérie. Le mycélium a une texture veloutée à granuleuse, à centre floconneux et à marge blanche étroite (1-2 mm) et fine. Le revers de la colonie est de couleur orange-brun pâle. Sur milieu MEA, le mycélium est lisse, à texture veloutée à floconneuse au centre et à marge translucide. Au microscope, les conidiophores apparaissent biververticillés et rugueux; les conidies sont de forme globuleuse ou elliptique, lisses à rugueuses.

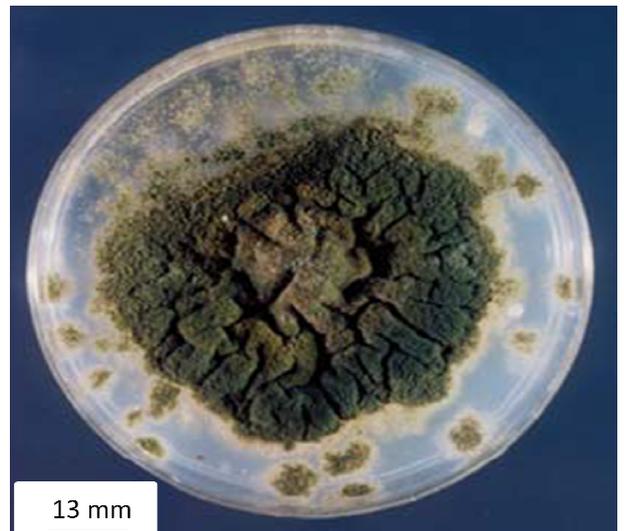
2. Distribution des genres fongiques dans les échantillons analysés

2.1. Résultats généraux

Les résultats de l'analyse fongique des 108 échantillons de blé et dérivés (récoltes de 2004 et 2006) collectés pendant les phases de pré-récolte, stockage dans les silos et à différentes étapes de transformation au niveau d'une meunerie et d'une semoulerie, sont consignés dans les tableaux 17, 18 et 19. Le nombre de propagules fongique varie entre 144 et 1277 cfu/g. Cette fluctuation dans la densité n'est pas liée à un paramètre particulier. En effet, une grande hétérogénéité est observée

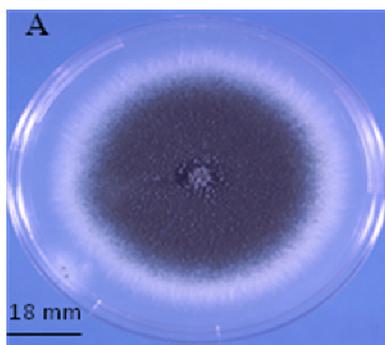


Aspergillus flavus NRRL 3251.

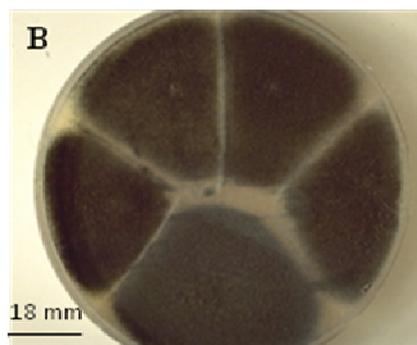


Aspergillus parasiticus CBS 100926.

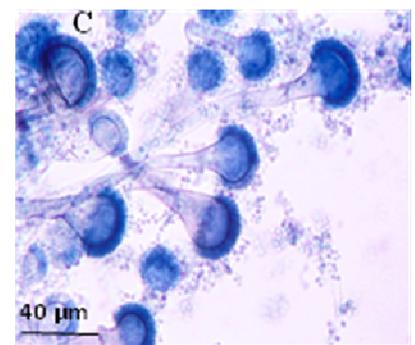
Colonies des souches de référence poussant sur milieu Czapek après 7 jours d'incubation à 25°C.



A: colonie sur milieu CYA

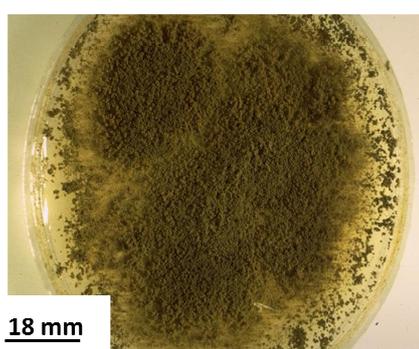


B: colonie sur milieu MEA

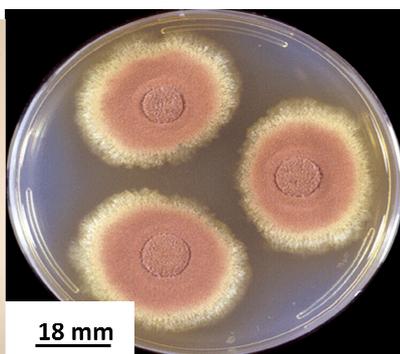


C: aspect microscopique

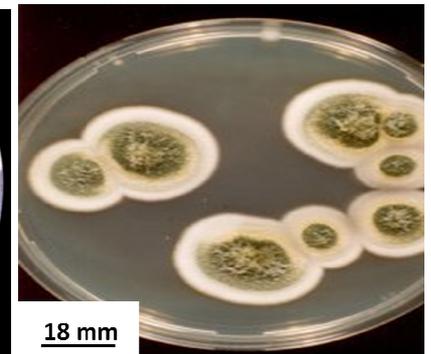
Aspergillus fumigatus



Aspergillus tamarii



Aspergillus terreus



Aspergillus versicolor

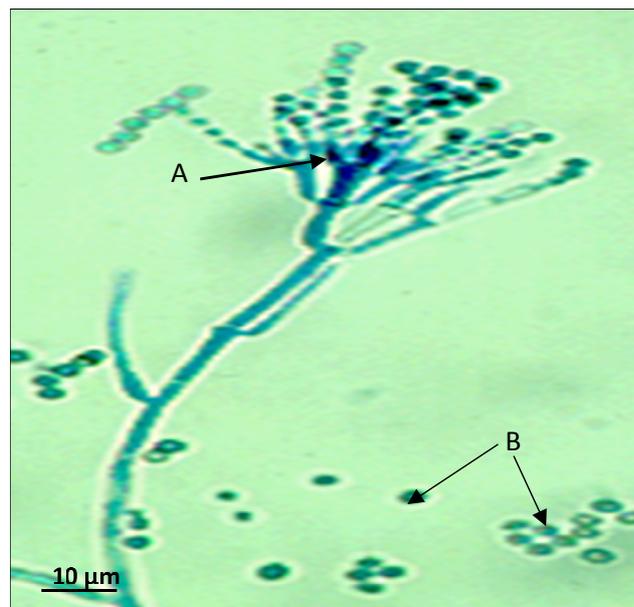
Figure 22. Morphologie des principales espèces étudiées appartenant au genre *Aspergillus*.



A: colonies sur CYA.

B: colonies sur MEA.

Aspect macroscopique.



C: aspects microscopiques (appareil sporifère (A) et conidies (B)).

Figure 23. Isolat de *Penicillium verrucosum* producteur d'ochratoxine A.

Tableau 17. Distribution des principaux genres fongiques isolés des échantillons de blé stockés et non stockés de la récolte 2004.

Origine	Région de Sétif		Région de Boumerdès	CCLS de Tizi Ouzou ^a	
	Champ ^b	Silo 1 ^d	Champ ^c	Silo 2 ^d	Silo 3 ^e
Nombre d'échantillons	20	10	7	14	10
Flore fongique (CFU/g)	1100 ± 135 ^f	480 ± 96 ^f	672 ± 133 ^f	670 ± 143 ^f	1277 ± 243 ^f
Température (°C)	18–37	24	22–35	27	35
Humidité relative	51	28	68	32	31
Principaux genres (%)					
<i>Aspergillus</i>	72	81,8	38	74	70,6
<i>Penicillium</i>	6,8	10	5	14	12
<i>Fusarium</i>	12,6	2	32	5,3	6,5
<i>Alternaria</i>	6	–	13	3	6,3
<i>Mucor</i>	1,6	2	2	1,3	2,6
Autres	1	4,2	10	2,4	2

^aLes échantillons collectés au niveau de la CCLS de Tizi Ouzou proviennent des récoltes de la région d'Alger, de Boumerdès et de Tizi Ouzou.

^bGrains de blé de la récolte 2004, prélevés dans 2 parcelles situées dans le Nord et l'Ouest de la ville de Sétif.

^c Grains de blé de la récolte 2004, prélevés dans une parcelle dans la région de Boumerdès.

^d Grains de blé stockés durant 6 mois dans le silo (récolte de 2004).

^e Grains de blé stockés durant 12 mois dans le silo (récolte de 2004).

^fMoyenne ± écart-type.

dans la densité de la flore fongique au sein des échantillons de même origine et de même catégorie. Les principaux genres fongiques isolés sont *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Mucor*. Le genre *Aspergillus* est le genre dominant dans la majorité des échantillons analysés (Figure 24). Les céréales sont sans doute les denrées alimentaires les plus fréquemment contaminées par les moisissures. La contamination peut se faire à différentes étapes de la filière: production, stockage, transport, transformation ou conditionnement (Doré *et al.*, 2002). Aucune production végétale n'échappe à priori aux risques liés à la contamination par les moisissures et leurs mycotoxines.

2.2. Distribution dans les échantillons blé non stocké (pré-récoltes)

L'analyse des 27 échantillons de blé de la récolte de 2004 collectés au champ ont révélé une nette dominance du genre *Aspergillus* dans la région de Sétif avec un taux de 72% de la flore fongique totale. Ce taux n'est que de 38% mais reste le plus élevé dans les échantillons provenant d'une parcelle de blé dans la région de Boumerdès. Les autres champignons filamenteux isolés sont des espèces de *Fusarium* spp. (12,6 et 32%), *Alternaria* spp. (6 et 13%), *Penicillium* spp. (5 et 6,8%) et *Mucor* spp. (1,6 et 2%).

Les proportions des genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* ainsi que les principales espèces du genre *Aspergillus* potentiellement toxigènes isolés des 23 échantillons de blé de la récolte de 2006 sont présentées dans le tableau 19. Le genre *Aspergillus* a été retrouvé dans tous les échantillons avec des taux allant de 14 à 43%, soit une moyenne de 28,5%. Ces fréquences sont moins élevées que celles enregistrées dans les échantillons de blé et dérivés de la récolte de 2004. Les taux moyens du genre *Aspergillus* dans les échantillons de blé de la région de Sétif et dans la Mitidja et les régions voisines sont respectivement de 31,2% et 25,7% (Figure 25). Le genre *Penicillium* a été isolé dans la majorité des échantillons à des proportions allant de 4 à 26%. Les fréquences moyennes dans les échantillons de la Mitidja et les régions voisines et dans la région de Sétif sont de 10,7% et de 16,7% respectivement.

Le taux d'*Aspergillus* (72%) dans les échantillons de la récolte de 2004 prélevés à Sétif est plus de deux fois plus élevé que celui de la récolte de 2006 (31,2%). Cependant, le taux moyen d'*Aspergillus* (38%) des échantillons de blé prélevés dans la région de Boumerdès en 2004 est légèrement supérieur au taux moyen des échantillons prélevés en 2006 dans la Mitidja et les régions voisines (25,7%). Les échantillons de blé de la récolte de 2004 présentent donc un taux moyen plus élevé en *Aspergillus* que ceux de 2006.

Tableau 18. Distribution des principaux genres fongiques isolés des échantillons de blé tendre et de blé dur et de leurs dérivés, collectés en 2005 au niveau de la meunerie de Tademaït (Tizi Ouzou) et de la semoulerie de Baghlia (Boumerdès).

Origine Source	Meunerie (Blé tendre)				Semoulerie (Blé dur)			
	BPN ^a	BN ^b	Farine	Son	BPN ^a	BN ^b	Semoule	Son
Nombre d'échantillons	3	3	3	3	3	3	3	3
Flore fongique (CFU/ g)	650 ± 122 ^c	550 ± 230 ^c	275 ± 45 ^c	350 ± 80 ^c	750 ± 150 ^c	600 ± 220 ^c	300 ± 66 ^c	400 ± 86 ^c
Température	24	28	36	ND	23	31	30	ND
Humidité relative	31	51	60	ND	30	50	57	ND
Principaux genres (%)								
<i>Aspergillus</i>	66	73,6	95	52,6	84	85	57	69
<i>Penicillium</i>	12	17,4	5	47,4	14	9	43	30
<i>Fusarium</i>	12	9	–	–	2	–	–	1
<i>Alternaria</i>	2	–	–	–	–	6	–	–
<i>Mucor</i>	–	–	–	–	–	–	–	–
Autres	8	–	–	–	–	–	–	–

^aBPN: blé prénettoyé. ^bBN: blé nettoyé conditionné. ^c: Moyenne ± écart-type. ND: non déterminé.

Tableau 19. Flore fongique totale et fréquence des genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* et des principales espèces du genre *Aspergillus* dans les échantillons de blé de la récolte 2006 collectés dans la Mitidja et les régions voisines et dans la région de Sétif.

	Mitidja et régions voisines (13) ^a						Région de Sétif (10) ^b			
Localité	Blida	Mouzaïa	Tipaza	Rouiba	Boumerdès	Tizi Ouzou	Est ^c	Ouest	Nord	ITGC ^d
Nombre d'échantillons/localité	1	3	1	3	2	3	3	2	1	4
Flore fongique totale (cfu/g) (moyenne ± écart-type)	432 ± 156 ^f	223 ± 24 ^f	508 ± 176 ^f	150 ± 44 ^f	211 ± 30 ^f	220 ± 78 ^f	198 ± 86 ^f	160 ± 54 ^f	144 ± 23 ^f	640 ± 210 ^f
Principaux genres (%)										
<i>Aspergillus</i>	25	28	24	14	21	42	21	32	43	29
<i>Penicillium</i>	12	4	14	17	6	11	16	18	7	26
<i>Fusarium</i>	12	15	18	28	15	20	23	25	24	28
Principales espèces d' <i>Aspergillus</i> (%) ^e										
<i>A. flavus</i>	24	17	23	17	16	26	24	13	24	8
<i>A. niger</i>	22	34	54	32	15	4	22	9	33	58
<i>A. ochraceus</i>	0	23	0	22	0	0	25	0	0	0
<i>A. alliaceus</i>	0	15	0	0	0	0	0	0	0	32
<i>Aspergillus</i> spp.	54	27	23	29	59	70	29	79	50	2

^aNombre total d'échantillons collectés, durant le mois d'Août, au niveau de la CCLS de Blida. ^bNombre total d'échantillons collectés, durant le mois d'Août, au niveau de la CCLS de Sétif. ^cPosition par rapport à la ville de Sétif. ^dEchantillons prélevés au niveau de la station expérimentale de l'Institut Technologique des Grandes Cultures (ITGC) située à l'Ouest de la ville de Sétif. ^e% par rapport au total d'*Aspergillus*. ^fMoyenne ± écart-type.

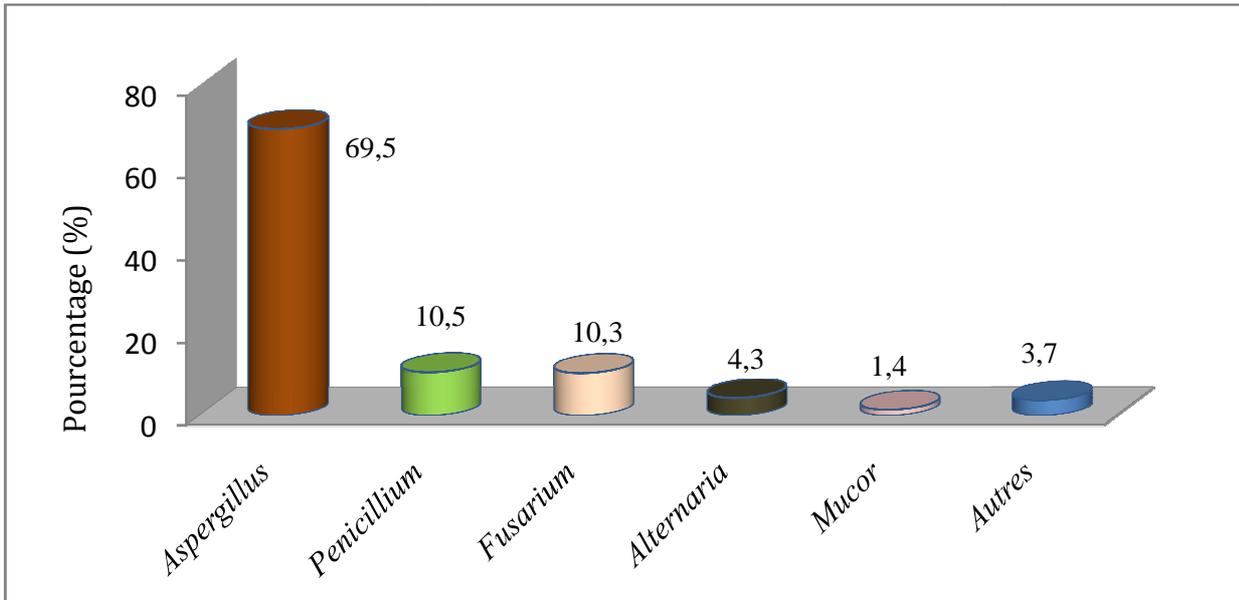


Figure 24. Fréquence moyenne des principaux genres fongiques isolés des 85 échantillons de blé et dérivés de la récolte de 2004.

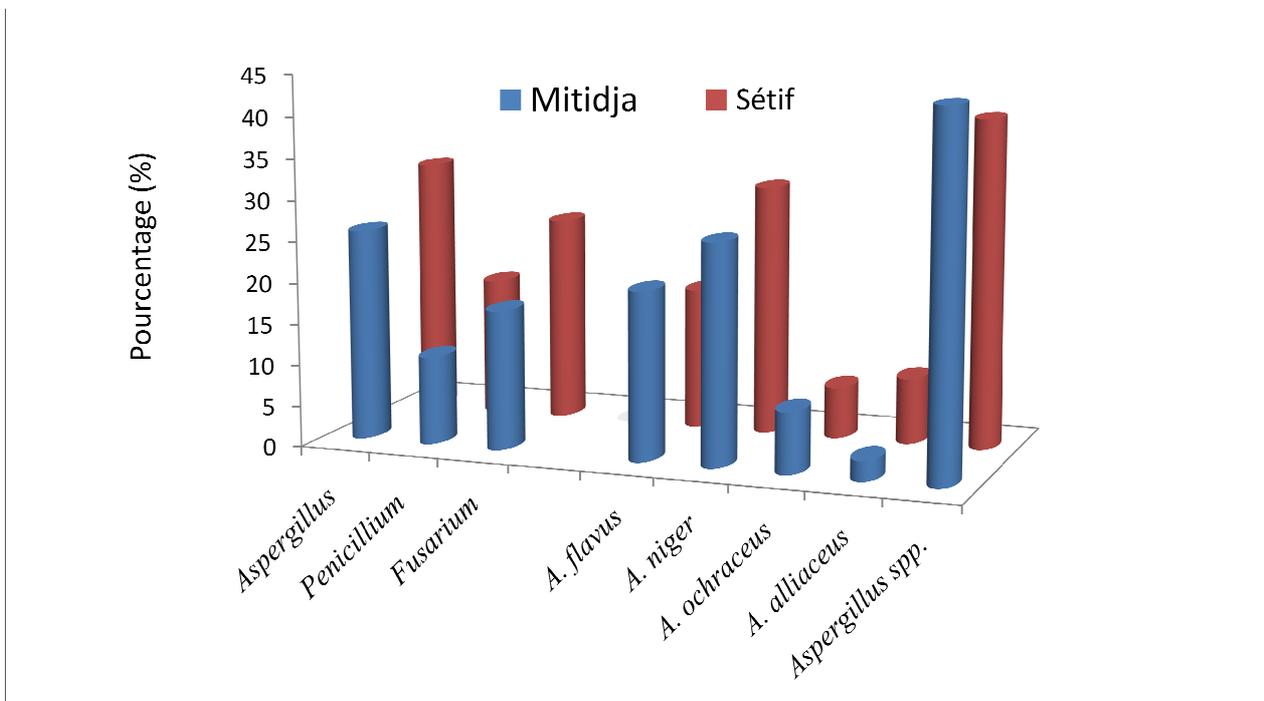


Figure 25: Fréquence moyenne des genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* et des principales espèces potentiellement toxigènes dans les échantillons de blé de la récolte de 2006.

Note: - le pourcentage des genres est donné par rapport au total des champignons dénombrés.
 - le pourcentage des espèces d'*Aspergillus* est donné par rapport au total des *Aspergillus*.

Globalement, les résultats obtenus montrent une dominance relative du genre *Aspergillus* surtout dans les échantillons de la récolte de 2004 prélevés dans la région de Sétif. *Aspergillus* est un champignon ubiquitaire capable de coloniser divers substrats et possède une grande capacité de sporulation (Gourama et Bullerman, 1995). Les données bibliographiques actuelles indiquent que les *Aspergillus* spp. sont très répandus dans la nature (Pařenicová *et al.*, 1997 et 2000) et tout particulièrement dans les régions à climat chaud comme l'Algérie (Mantle, 2002; Hocking et Pitt, 2003). Ainsi, la plupart des enquêtes menées dans ces régions ont mis en évidence la prédominance des espèces fongiques du genre *Aspergillus* dans les céréales. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés sur les grains de céréales et d'autres graines (Varga *et al.*, 1996; Berghofer *et al.*, 2003; Accensi *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2007), notamment le blé (Mazen *et al.*, 1984, Weidenbörner *et al.*, 2000).

2.3. Distribution dans les échantillons de blé stockés dans les silos

L'humidité relative et la température mesurées dans les silos au moment des prélèvements varient respectivement de 28 à 32% et de 23 à 35°C (Tableau 17). Les résultats de l'analyse des échantillons de blé stockés durant 6 à 12 mois, ont montré une nette dominance du genre *Aspergillus* dont le pourcentage oscille entre 66 à 84%. Le genre *Penicillium* a été isolé à des fréquences allant de 10 à 14% dans les mêmes échantillons. La flore contaminant les céréales au cours du stockage est constituée par des moisissures xérotolérantes qui sont capables de se développer à de faibles activités de l'eau (Miller et Trenholm, 1994). Comme *Aspergillus*, *Penicillium* peut aussi croître à de faibles activités de l'eau et de ce fait, il est considéré comme un champignon de « stockage » (Christensen, 1981). Par contre, le stockage pour une longue durée (12 mois) montrent une faible fréquence des genres *Fusarium* (2–6,5%) et *Alternaria* (0–6,3%) lesquels sont considérés comme des champignons de « champs » (Christensen *et al.*, 1977).

2.4. Distribution dans les échantillons de blé et dérivés (farine, semoule et son de blé)

Le niveau de contamination des échantillons de blé prénettoyé et de blé nettoyé est à peu près comparable dans les deux unités de transformation, la meunerie (blé tendre) et la semoulerie (blé dur) (Tableau 18). En effet, le nombre de moisissures varie entre 550 et 750 cfu/g. La flore fongique des échantillons de blé tendre et de blé dur nettoyés et conditionnés, est composée respectivement de 73,6% et de 85% d'*Aspergillus*. Le blé nettoyé conditionné étant humidifié à raison de 18% à 20%, ceci favorise le développement des spores fongiques se trouvant au niveau des locaux et des équipements de transformation.

Les produits finis (semoule, farine et son de blé) présentent des teneurs en moisissures allant de 275 à 400 cfu/g. Ces valeurs sont moins importantes que celles rapportées par Hesseltine et Graves (1966) et Weidenbörner *et al.* (2000). Au cours du processus de transformation, environ 50% de la flore fongique dénombrée dans les grains de blé nettoyés se retrouve dans le son. En

général, la plus forte densité de moisissures se trouvent dans la périphérie du grain et de ce fait l'élimination des débris des grains réduira la contamination (Chelkowski *et al.*, 1981b ; Schollenberger *et al.*, 2002). Dans la semoule et le son de blé, nous observons une co-dominance des genres *Aspergillus* (surtout) et *Penicillium*, alors que dans la farine, *Aspergillus* représente 95% de la flore fongique totale. Les *Fusarium* spp. ont été détectées dans le blé tendre, prénettoyé et nettoyé, à des taux respectifs de 12 et 9%.

3. Distribution des espèces d'*Aspergillus* dans les échantillons analysés

Parmi les espèces d'*Aspergillus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor* et à un degré moindre, *A. terreus*, sont les plus dominantes dans les 85 échantillons de la récolte de 2004 (Tableaux 20 et 21; Figure 26). *Aspergillus flavus*, isolée dans tous les échantillons, représente 18 à 40,7% du genre *Aspergillus*. Dans les échantillons de la récolte de 2006, *A. flavus* représente des taux compris entre 8 et 26% (Tableau 19; Figure 25). Les proportions moyennes respectives de cette espèce dans la Mitidja et les régions voisines et dans la région de Sétif sont de 20,5% et 17,2%. Ces proportions sont comparables à celles des échantillons de la récolte de 2004 (25,7 et 18%) pour le blé non stocké (pré-récolte). Cependant, la plus forte incidence de cette espèce est enregistrée dans les échantillons stockés durant 6 et 12 mois (34 et 40,7%). Le blé tendre et le blé dur destinés à la transformation contiennent des teneurs allant de 24,5 à 29% d'*A. flavus*. Les pourcentages respectifs de cette espèce dans la farine et la semoule sont de 9 et 6%.

Aspergillus flavus est très répandue dans les climats chauds et occupe des niches écologiques très diverses (Wilson *et al.*, 2002). Cette espèce vit dans le sol à l'état saprophyte mais est capable de provoquer le pourrissement des grains (Horn et Dorner, 1998). Des enquêtes menées en Egypte (Abdel Hafez *et al.*, 1990 ; Atalla *et al.*, 1993), en Australie (Berghofer *et al.*, 2003), en Iran (Ghiasian, 2004), en Turquie (Baydar *et al.*, 2005) et en Roumanie (Tabuc, 2007), ont montré la dominance d'*A. flavus* dans le blé.

Les fréquences d'*A. niger* dans les échantillons de blé de la récolte de 2004 collectés au champ dans la région de Sétif et de Boumerdès sont respectivement de 33,1 et 49%. Les échantillons de la récolte de 2006 ont révélé des proportions allant de 4 à 58% avec des proportions moyennes de 25 et 30% pour la région de la Mitidja et de Sétif respectivement. Dans les échantillons stockés durant 6 mois, *A. niger* représente 27 et 22 % du total d'*Aspergillus* contre 9,3% dans le blé stocké durant 12 mois. Cette espèce a été isolée à des teneurs relativement élevées dans la farine et la semoule (22 et 20%). Comme *A. flavus*, *A. niger* est un champignon ubiquitaire capable de coloniser une grande variété de produits. Dans les climats chauds, *A. niger* est très

Tableau 20. Distribution des espèces d'*Aspergillus* isolées des échantillons de blé stockés et non stockés de la récolte de 2004.

Origine	Région de Sétif		Région de Boumerdès	CCLS de Tizi Ouzou ^a	
	Champ ^b	Silo 1 ^c	Champ ^d	Silo 2 ^c	Silo 3 ^e
Nombre d'échantillons	20	10	7	14	10
Espèces d' <i>Aspergillus</i> (%) ^f					
<i>A. flavus</i>	25,7	32	18	35	40,7
<i>A. niger</i>	33,1	27	49	22,3	9,3
<i>A. versicolor</i>	14	28	18	10	21
<i>A. terreus</i>	12	7	1,3	19	1,5
<i>A. ochraceus</i>	2	3	–	4,5	1,5
<i>A. carbonarius</i>	–	–	7,1	–	1,5
<i>A. fumigatus</i>	–	–	–	4,2	4,5
<i>A. alliaceus</i>	–	–	3	–	2
<i>A. candidus</i>	–	–	–	–	–
<i>A. glaucus</i>	4,2	–	–	1	13
<i>Aspergillus</i> spp.	9	3	3,6	4	5

^aLes échantillons collectés au niveau de la CCLS de Tizi Ouzou proviennent des récoltes de la région d'Alger, de Boumerdès et de Tizi Ouzou.

^bGrains de blé de la récolte 2004, prélevés dans 2 parcelles situées dans le Nord et l'Ouest de Sétif.

^cGrains de blé stockés durant 6 mois dans le silo.

^dGrains de blé de la récolte 2004, prélevés au champ.

^eGrains de blé stockés durant 12 mois dans le silo.

^fPourcentage par rapport au total des *Aspergillus*.

Tableau 21. Distribution des espèces d'*Aspergillus* isolées des échantillons de blé et dérivés récoltés dans la meunerie de Tademaït et de la semoulerie de Baghlia.

Origine	Meunerie (Blé tendre)				Semoulerie (Blé dur)				
	Source	BPN	BN	Farine	Son	BPN	BN	Semoule	Son
Nombre d'échantillons	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Espèces d' <i>Aspergillus</i> (%)									
<i>A. flavus</i>	29	24,5	9	8	25	28	6	16	
<i>A. niger</i>	20	24	22	8	30	21	20	5	
<i>A. versicolor</i>	13	12	2	26	11	12	20	25	
<i>A. terreus</i>	14	7,4	–	12	11	13	–	16	
<i>A. ochraceus</i>	4	–	–	–	5	–	–	–	
<i>A. carbonarius</i>	5	8,3	–	26	–	–	–	–	
<i>A. fumigatus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	
<i>A. alliaceus</i>	–	7	16	–	–	–	8	–	
<i>A. candidus</i>	–	8	47	6	–	14	31	–	
<i>A. glaucus</i>	5	2,6	–	2	18	12	15	38	
<i>Aspergillus</i> spp.	10	6,2	4	12	–	–	–	–	

BPN: blé prénettoyé; BN: blé nettoyé conditionné.

^aPourcentage par rapport au total des *Aspergillus*.

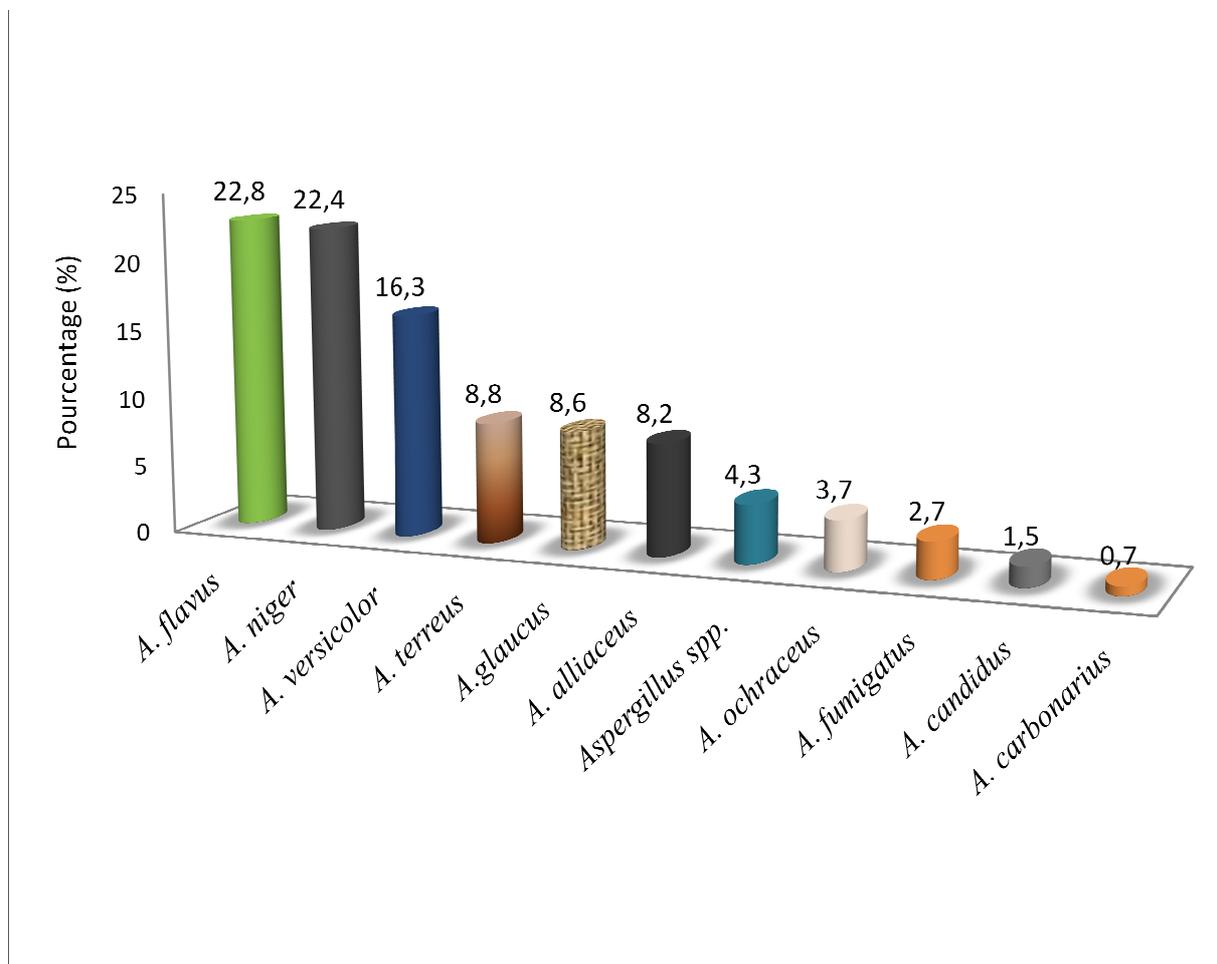


Figure 26. Fréquence des principales espèces du genre *Aspergillus* isolées des échantillons de blé et dérivés de la récoltes 2004.

Note: les pourcentages sont donnés par rapport au total des *Aspergillus*.

abondant, parmi les espèces ochratoxinogènes, dans les produits alimentaires, qu'ils soient des denrées stockées ou non stockées (Accensi *et al.*, 2004). La prévalence des membres d'*A. niger* dans les échantillons de blé de pré-récolte est liée à la résistance de leurs spores noires aux rayons solaires et aux radiations UV (Serra *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 2005). Nos résultats montrent que la fréquence d'*A. niger* dans les blés prénettoyés et nettoyés, dans la farine et dans la semoule oscillent entre 20 et 30%, alors que les deux échantillons de son de blé contiennent 8 et 5%. La présence d'*A. niger* à des proportions relativement élevées dans la farine et la semoule, serait attribuée à une forte contamination des locaux de transformation par les spores de cette espèce. En outre, on peut aussi évoquer la possibilité d'une contamination du blé avant la récolte par migration entre les enveloppes du grain (endogène).

Aspergillus versicolor a été isolée dans tous les échantillons de 2004 avec des fréquences allant de 10 à 28%, excepté la farine. Par contre, cette espèce n'a été isolée que très rarement dans les échantillons de 2006. Elle est rarement rapportée comme contaminant des céréales, mais est considérée comme hautement xérophile (Pitt *et al.*, 1998). *Aspergillus terreus* a également été isolée dans la plupart des échantillons de 2004 et 2006, mais à des fréquences moins importantes que celles d'*A. flavus* et d'*A. niger*. *Aspergillus candidus* est l'espèce prédominante dans les échantillons de farine (47%) et de semoule (31%). La prédominance de cette espèce dans la farine a été signalée par Weidenbörner *et al.* (2000).

Les espèces typiquement ochratoxinogènes, *A. ochraceus*, *A. carbonarius* et *A. alliaceus* sont faiblement représentées dans les échantillons analysés. Cependant, au niveau de la meunerie, *A. carbonarius* et *A. alliaceus* représentent 26 et 16% du total des *Aspergillus* du son de blé et de la farine. *Aspergillus alliaceus* et *A. ochraceus* ont été isolées dans 4 sur les 23 échantillons de la récolte de 2006: 2 échantillons de blé tendre (HD1220) provenant de la région de la Mitidja et 2 échantillons de blé dur (variété Waha) provenant de la région de Sétif (Tableaux 19, 20 et 21).

Des teneurs faibles d'*A. ochraceus* et d'*A. alliaceus* dans le blé ont également été rapportées dans la littérature (Wallace et Sinha, 1962; Samson *et al.*, 2006). *Aspergillus carbonarius* a été retrouvée dans 5 échantillons d'origine différente (blé du champ, blé stocké, blé tendre prénettoyé et nettoyé et son de blé). Cette espèce n'a pas été rapportée dans la bibliographie comme contaminant du blé. La majorité des études réalisées sur la contamination par les *Aspergillus* spp. des produits alimentaires considèrent qu'*A. carbonarius* est moins fréquente qu'*A. niger*. Mais il est fort probable que les deux espèces soient confondues lors de l'identification basée sur les caractères macroscopiques. Il faut rappeler qu'*A. carbonarius* peut facilement être distingué d'*A. niger* « aggregate » par la plus grande taille de ses conidies (supérieure à 6 µm). *Aspergillus fumigatus* a été isolée dans deux échantillons de blé stockés de la récolte de 2004 et dans un échantillon de blé

de la récolte de 2006. Cette espèce, comme *A. terreus* et *A. flavus*, est connue pour être pathogène pour l'homme, puisqu'elle provoque les aspergilloses invasives (Denning, 1998) et pulmonaires (Summerbell, 1998).

II. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines par les isolats d'*Aspergillus*

section *Flavi*

Nous avons étudié le pouvoir producteur d'aflatoxine de 150 souches appartenant à la section *Flavi* isolées des échantillons de blé et dérivés collectés en 2004 et en 2006. Le screening des souches aflatoxinogènes basé sur la mise en évidence de la fluorescence sous U.V. sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et sur CCM, a révélé un taux de production de 30 et 31,3% respectivement (Figure 27). La fluorescence des aflatoxines sur milieu de culture est illustrée sur la figure 28. La détection de la production d'aflatoxines par visualisation de la fluorescence sur milieu CAM est aussi performante que la détection par CCM. En effet, les deux méthodes ont révélé des pourcentages de production similaires. Seuls deux isolats faiblement producteurs s'avèrent être de faux négatifs sur milieu CAM. Cependant, l'analyse par HPLC a révélé un taux de 72% d'isolats aflatoxinogènes. L'HPLC munie d'une cellule de dérivation au brome, KobraCell®, placée en post-colonne, a permis de détecter même les isolats faiblement producteurs (quantités inférieures à 0,05 µg/g) grâce à la transformation des aflatoxines en leur dérivés bromés, 9,10-dibromé, qui vont présenter une fluorescence nettement supérieure à celle existant naturellement. La figure 29 montre des chromatogrammes des isolats producteurs d'aflatoxine B1 (AFB1) et d'aflatoxine B2 (AFB2).

Les quantités d'AFB1 produites sur milieu de culture à base de noix de coco (CAM) par les différents isolats sont très variables. Selon les quantités d'aflatoxine B1 produites, les isolats aflatoxinogènes ont été subdivisés en 5 catégories (Tableau 22; Figure 30). On peut ainsi distinguer des isolats fortement producteurs ayant produit des quantités allant de 103 à 234,6 µg/g de milieu. Cette catégorie représente 15% des 150 isolats testés. Les isolats moyennement producteurs sécrètent des quantités variant entre 12,1 et 95,7 µg/g de milieu (25%). Les isolats faiblement producteurs (1,7 – 7,7 µg/g) représentent 5% du total des isolats testés. Ceux produisant des quantités à l'état de traces (0,02 – 0,09 µg/g) représentent 27% et les isolats non producteurs, représentent 28%. Il faut noter que parmi les 150 isolats analysés, aucun ne produit l'aflatoxine de type G. Cependant, les isolats fortement producteurs d'AFB1 produisent également des quantités d'AFB2 allant de 4,6 à 125 µg/g de milieu.

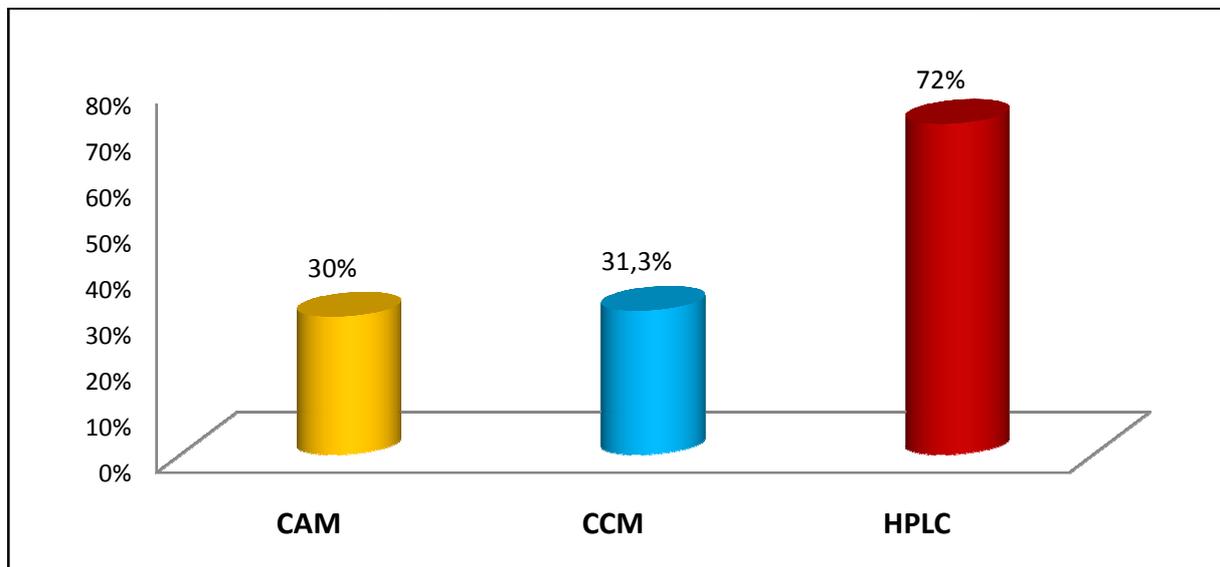


Figure 27. Fréquence des isolats aflatoxinogènes d'*Aspergillus flavus* déterminée par visualisation de la fluorescence sur milieu CAM, sur CCM et par HPLC.

Note. Les isolats ont été cultivés sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) pendant 5 jours à 28°C.

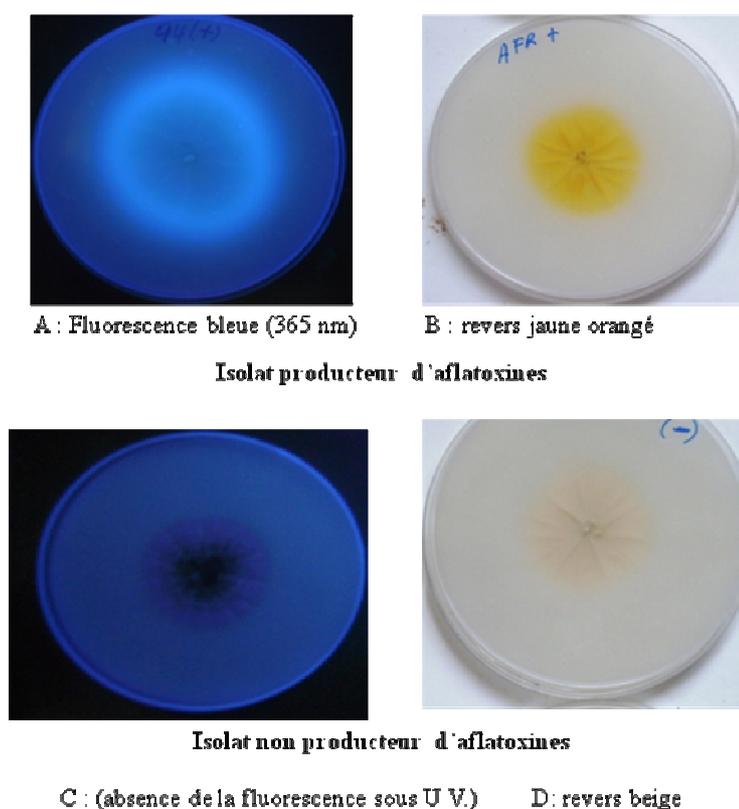


Figure 28. Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V. (365 nm) de la production des aflatoxines par *Aspergillus flavus* sur milieu à base d'extrait de noix coco.

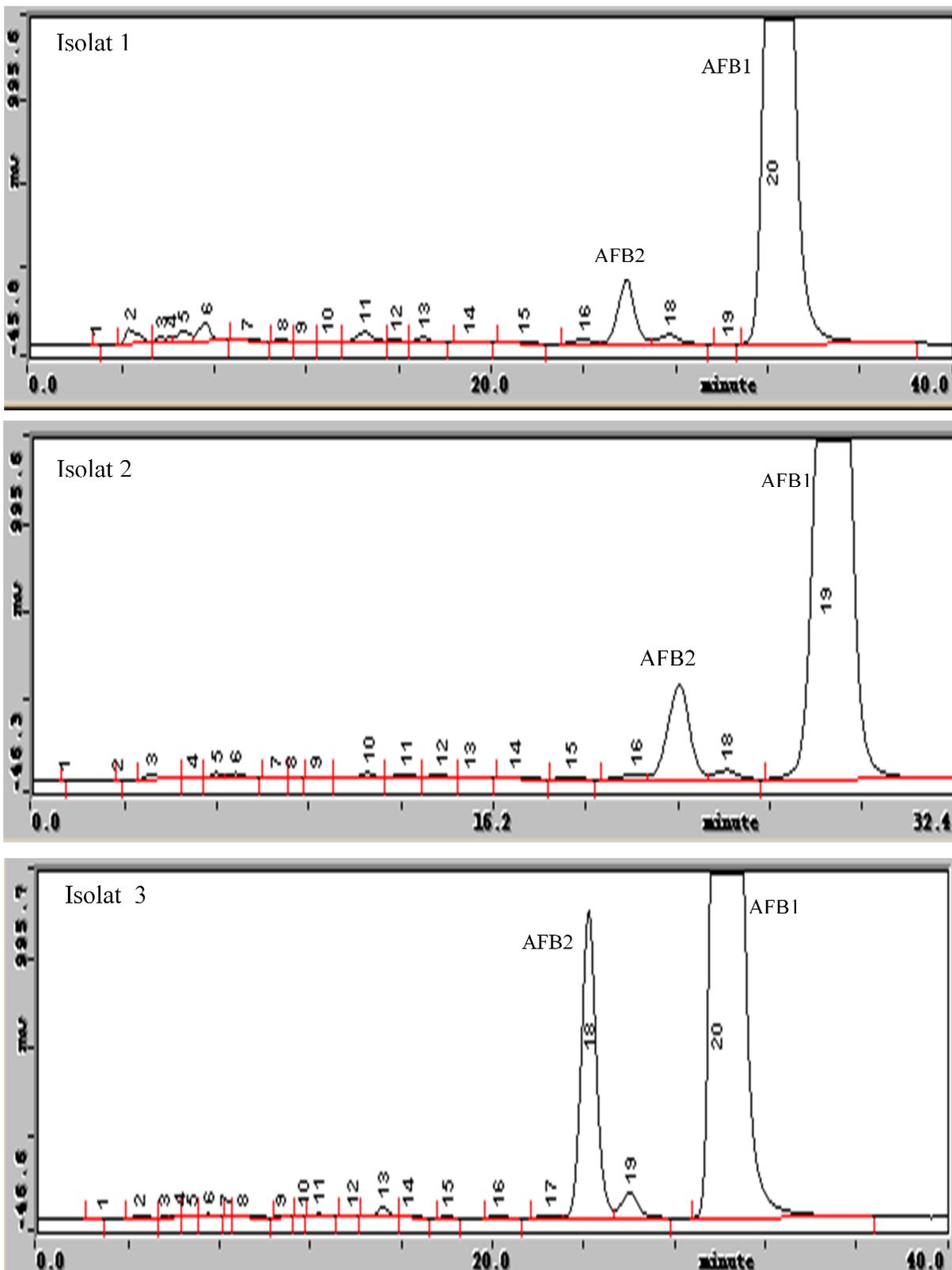


Figure 29. Chromatogrammes des extraits méthanoliques de trois isolats d'*Aspergillus flavus* producteurs d'aflatoxine B1 (AFB1) et d'aflatoxine B2 (AFB2).

Programme HPLC:

Phase mobile composée de méthanol-acétonitrile-eau (20:20:60 v/v) + (119 mg de KBr + 350 µl de HNO₃ 4M). Débit: 0,5 ml/min. Pression: 28-30 mPa. Volume d'injection: 20 µl. λ ex. 362 nm; λ em. 425 nm.

L'analyse est réalisée en condition isocratique.

Tableau 22. Répartition des 150 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* en fonction des quantités d'AFB1 produites sur milieu CAM incubé pendant 5 jours à 28°C.

AFB1 ($\mu\text{g/g}$) ^a	Nombre d'isolats	Pourcentage (%)
103 – 234,6	23	15%
12,1 – 95,7	37	25%
1,67 – 7,7	8	5%
0,02 – 0,09	40	27%
< à 0, 005	42	28%

^aLes quantités produites d'aflatoxine B1 (AFB1) ont été déterminées après analyse par HPLC.

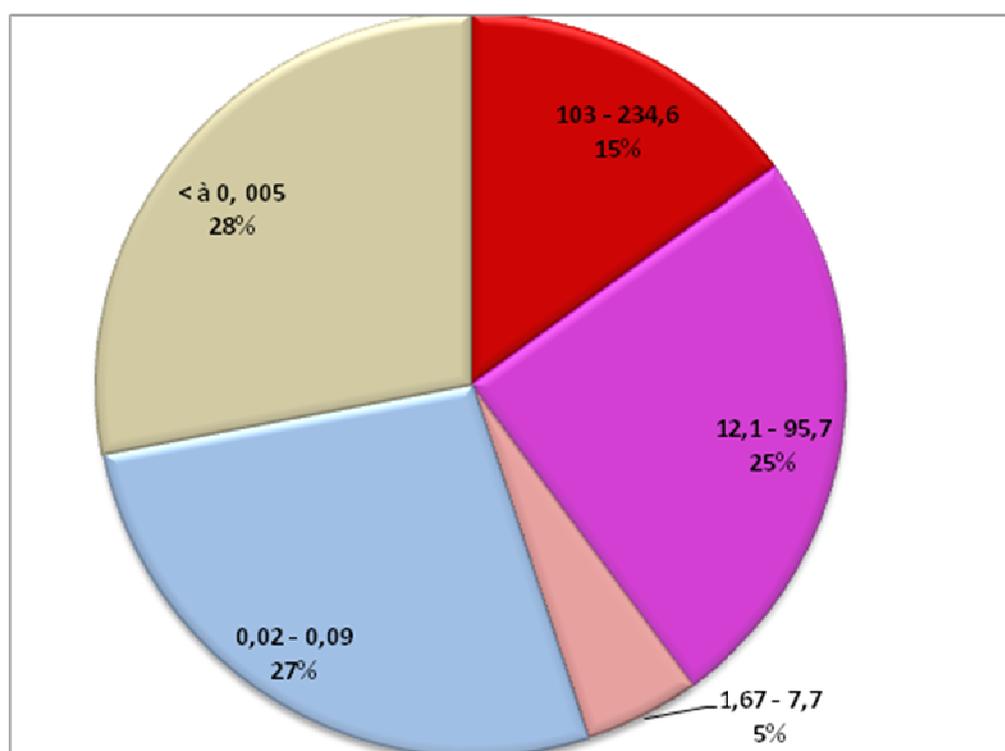


Figure 30. Répartition des isolats aflatoxinogènes (en %) en fonction des quantités d'AFB1 produites ($\mu\text{g/g}$ de milieu) sur milieu CAM à base d'extrait de noix de coco.

La majorité des échantillons de blé a été collecté au niveau des CCLS. Ces organismes ont pour mission la collection des récoltes de céréales et des légumes secs ainsi que leur distribution après avoir effectué des opérations de tri pour sélectionner les graines destinées à la semence. Ainsi, en fonction des besoins, des échanges des graines de semences sont parfois effectués entre les différentes régions. Ceci entraîne sans doute des contaminations croisées et rend difficile toute interprétation quant à la distribution des champignons toxigènes en fonction d'un type de climat ou d'une région donnée.

Les différences dans la distribution géographique du groupe d'*A. flavus* est le résultat d'une pression de sélection exercée par une multitude de facteurs environnementaux (Horn *et al.*, 1996; Pildain *et al.*, 2004). Ainsi, la température, les conditions culturales, la lumière du jour, les précédents culturaux, l'incidence des insectes et la pluviométrie peuvent influencer les populations d'*A. flavus* (Orum *et al.*, 1997). Ces facteurs et d'autres microclimats peuvent être différents d'une région à l'autre. La distribution spatiale des populations de la section *Flavi* est aussi corrélée avec la latitude (Cotty, 1999).

Aspergillus flavus, *A. parasiticus* et *A. nomius* sont les espèces productrices d'aflatoxines les plus communes. Ces deux dernières espèces produisent les aflatoxines B et G (Dorner *et al.*, 1984; Kurtzman *et al.*, 1987; Horn *et al.*, 1996; Klich, 2007). Aucun de nos isolats n'a produit d'aflatoxines de type G ce qui suggère l'absence d'*A. parasiticus* parmi ceux-ci. D'après Ehrlich *et al.*, (2007), *A. nomius*, *A. tamarisii* et *A. pseudotamarisii* ne poussent pas à 42°C. En revanche, nos isolats producteurs d'aflatoxines poussent tous à cette température ce qui suggère l'absence d'*A. nomius* et d'*A. pseudotamarisii* producteurs d'aflatoxines dans les échantillons analysés. Ces résultats laissent penser que les populations aflatoxinogènes contaminant le blé algérien sont dominées par *A. flavus*. Selon de nombreux auteurs (Bennett et Papa 1988; Frisvad et Samson, 2000; Geiser *et al.*, 2000; Varga *et al.*, 2003; Frisvad *et al.*, 2004) les espèces productrices d'aflatoxines (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. parvisclerotigenus*, *A. bombycis* et *A. pseudotamarisii*) sont très proches du point de vue phénotypique et phylogénique.

L'AFB2 détectée chez la plupart des isolats fortement producteurs d'AFB1 est produite à des teneurs beaucoup moins élevées que cette dernière. La capacité de production d'aflatoxines par nos isolats est extrêmement variable. Les quantités produites sur milieu de culture sont en effet comprises entre 0,02 à 234,6 µg/g.

III. Caractérisation des *Aspergillus* section *Flavi* en fonction de la production d'aflatoxines, d'acide cyclopiazonique et de sclérotés.

Sur la base de la production d'aflatoxines, d'acide cyclopiazonique et des sclérotés, les 150 souches appartenant à la section *Flavi* ont été subdivisées en 8 groupes (Tableau 23).

Le groupe I est constitué de 45 isolats ne produisant pas d'aflatoxines, de CPA et de sclérotés. Ce groupe représente 30% du total des souches d'*Aspergillus* section *Flavi* analysées. Dans ce groupe, on retrouve six souches qui se distinguent par un mycélium de couleur vert olive tirant sur le brun (vert kaki) avec une texture granuleuse et par leur incapacité à croître à 42°C. D'après ces caractères morphologique et physiologique, ces souches seraient rattachées à *A. tamarii* (Pitt et Hocking, 1997).

Le groupe II inclue les 45 isolats produisant l'aflatoxine de type B, mais pas de CPA et de sclérotés. Ce groupe représente 30% du total des isolats analysés.

Le groupe III (30 isolats, 20% du total) produit uniquement le CPA sans aflatoxines ni sclérotés.

Le groupe IV est constitué de 15 isolats ayant la capacité de produire l'aflatoxine B et les sclérotés mais pas le CPA. Ce groupe représente 10% des isolats testés.

Le groupe V, moins fréquent (6 isolats, 4% du total), produit l'aflatoxine B, le CPA et les sclérotés. Dans ce groupe on retrouve un isolat de type « S » (sclérotés < 400 µm) qui produit simultanément de fortes quantités d'AFB1 et d'AFB2. Cet isolat provient d'un échantillon de blé dur d'origine de Sétif.

Le groupe VI (3 isolats, 2% du total) produit les deux types de mycotoxines, l'aflatoxine B et le CPA, mais ne produit pas de sclérotés.

Le groupe VII (4 isolats, 2,7% du total) produit uniquement le CPA mais ne produit pas les aflatoxines et les sclérotés.

Le groupe VIII (2 isolats, 1,3% du total) est constitué d'isolats non aflatoxinogènes produisant le CPA et les sclérotés.

Les souches aflatoxinogènes semblent être distribuées aléatoirement dans les échantillons analysés. En effet, elles ont été isolées à partir de sources différentes (blé dur de différentes variétés, blé tendre, blé stocké et non stocké), dans les 2 régions (la Mitidja et Sétif) et ce pour les deux campagnes de récolte (2004 et 2006).

Tableau 23. Répartition des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* en différents groupes (morpho-chimiotypes) selon la production, d'AFB1, de CPA et de sclérotos.

Groupe	AFB1	CPA	Sclérotos ^a	Pourcentage (%) ^b
I	-	-	-	30
II	+	-	-	30
III	-	-	+	20
IV	+	-	+	10
V	+	+	+	4
VI	+	+	-	2
VII	-	+	-	2,7
VIII	-	+	+	1,3

^a Un seul isolat est de type S (sclérotos < à 400 µm), les autres isolats sont de type L (> 400 µm).

^b Pourcentage par rapport à 150 isolats testés.

AFB1: aflatoxine B1. CPA: acide cyclopiazonique

Les résultats relatifs à la production de CPA, détectée par CCM, indiquent un taux de production relativement faible (10%) par rapport aux données bibliographiques. Il est connu qu'*A. flavus* produit généralement les aflatoxines de type B1 et B2 et l'acide cyclopiazonique (CPA), mais cette production est extrêmement variable (Richard *et al.*, 1992; Horn et Dorner, 1999). En effet, on peut rencontrer une large gamme d'isolats allant de très fortement producteurs au non producteurs d'aflatoxines (Pitt, 1993; Horn *et al.*, 1996). Contrairement aux résultats que nous avons obtenus, de nombreux auteurs soulignent une corrélation positive entre la production d'aflatoxines de type B et de CPA. Ainsi, Frisvad *et al.* (2005) soulignent que le CPA est produit chez les souches productrices d'aflatoxine B, mais pas chez celles produisant l'aflatoxine de type G.

Dans une étude sur les *Aspergillus* section *Flavi* des sols de culture de maïs en Iran, Mehdi *et al.* (2006) soulignent, comme nous, une dominance d'*A. flavus* et une forte proportion d'isolats ne produisant pas les aflatoxines, le CPA et les sclérotés (groupe D). Ces auteurs rapportent un pourcentage d'isolats aflatoxinogènes comparable à celui que nous avons obtenu. Par contre, ils mentionnent un taux de production de CPA d'environ 75% et un taux de production de sclérotés de l'ordre de 6% parmi les isolats aflatoxinogènes. Giorni *et al.* (2007) trouvent que 70% des souches d'*A. flavus* isolées du maïs d'Italie sont aflatoxinogènes et la moitié produit également le CPA.

En outre, des différences dans la capacité de production des aflatoxines peuvent être associées à la taille des sclérotés (Cotty, 1989; Criseo *et al.*, 2001). D'après Hua (2002), tous les isolats de type « S » sont aflatoxinogènes, alors que le morphotype « L », le plus fréquent, comprend des producteurs et des non producteurs. Nos résultats ont révélé une faible proportion d'isolats aflatoxinogènes produisant des sclérotés (14%) et le morphotype « S » a été isolé une seule fois. Celui-ci est fortement producteur d'AFB1. Le type « S », signalé pour la première fois par Hesseltine *et al.* (1970) est rarement rencontré (Vaamonde *et al.*, 2003; Barros *et al.*, 2005; Giorni, 2007). Selon Carwell et Cotty (2002), les isolats de type « S » sont rencontrés fréquemment dans des régions à températures élevées et à faible pluviométrie. Ces auteurs pensent que la production de sclérotés de type « S » est une forme de survie aux fluctuations climatiques. Saito et Tsuruta (1993) ont classé auparavant le type « S » comme une variété d'*A. flavus*: *A. flavus* var. *parvisclerotigenus*, qui produit uniquement l'aflatoxine B. Frisvad *et al.* (2005), l'ont considéré comme une nouvelle espèce dont certains isolats produisent les aflatoxines B et G. Il est fort probable que l'isolat de type « S » que nous avons isolé soit rattaché à *A. parvisclerotigenus*.

L'incidence des isolats aflatoxinogènes est aussi liée à la nature du substrat (Horn, 2003). Par exemple, le nombre d'isolats aflatoxinogènes est plus élevé dans les arachides (69%) que dans le blé (13%) (Vaamonde *et al.*, 2003). Les conditions environnementales défavorables associées

probablement à l'environnement-sol incluant une température élevée, un pH bas et une carence en éléments nutritifs, contribuent au maintien du pouvoir producteur d'aflatoxines chez *A. flavus* pour des générations successives (Horn et Dorner, 2002).

IV. Identification moléculaire des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi*

1. Choix des souches

Le but de cette partie est d'évaluer la variabilité génétique des isolats aflatoxinogènes isolés des échantillons de blé et de comparer les résultats avec l'identification morphologique et chimiotypique. Pour cela nous avons choisi 08 isolats producteurs d'aflatoxine B et un isolat non producteur. Ces isolats provenant des différentes régions représentent les morphotypes et les chimiotypes des groupes I (AF18, non producteur d'aflatoxines), II (AFB3, AF9, AF48 et AF92), IV (AF14), V (AF94 et AF56) et VI (AF174) présentés dans le Tableau 23 (page 108). Deux souches de référence *A. flavus* NRRL 3251 et *A. parasiticus* CBS 100926^T, ont également été utilisées, cette dernière étant la souche-type.

2. Analyse par RFLP

Les profils électrophorétiques de restriction des régions IGS amplifiées, générés par l'enzyme BglII, ont permis de faire une distinction très nette entre nos isolats et *A. flavus* NRRL 3251 d'une part, et *A. parasiticus* CBS100926^T d'autre part. En effet, l'action de l'enzyme BglII a donné naissance à 4 bandes pour tous nos isolats et pour *A. flavus* NRRL 3251 et 3 bandes pour *A. parasiticus* CBS 100926^T (Figure 31). Ces résultats confortent l'idée avancée dans le paragraphe II (page 106) selon laquelle il n'y a pas d'*A. parasiticus* parmi nos isolats aflatoxinogènes.

3. Séquençage et phylogénie

Neuf isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* choisis en fonction de leur origine géographique, de la production d'aflatoxines, d'acide cyclopiazonique et de sclérotines ont fait l'objet du séquençage d'un amplicon correspondant à la région ITS1-5.8S-ITS2 de l'ADNr. Tous les isolats testés, dont huit aflatoxinogènes (AFB3, AF9, AF48, AF92, AF14, AF94, AF56 et AF174) et un (AF18) non producteur d'aflatoxines, ont donné des fragments amplifiés d'environ 590 paires de bases (Figure 32). Les résultats de l'alignement ont montré que les 8 isolats aflatoxinogènes sont identiques entre eux à 100% (annexe II). La souche AF18 (non aflatoxinogène) présente 99,8% de similarité avec ce groupe. Le programme BLAST a montré des pourcentages de similarité supérieurs ou égaux à 99,8% avec les séquences de plusieurs dizaines d'espèces d'*A. flavus* disponibles dans la banque de donnée GenBank. Les pourcentages de similarité obtenus avec les souches-types aflatoxinogènes

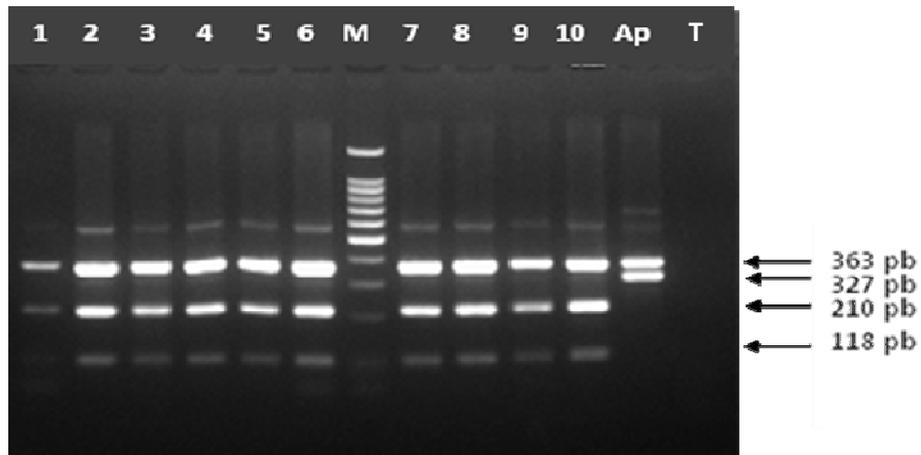


Figure 31. Profil électrophorétique des fragments de restriction générés par l'enzyme BglIII de la portion IGS amplifiée à partir des amorces IGS-F et IGS-R. Lignes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9: isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* (AF9, AF14, AF48, AF56, AF92, AF94, AF174, AFB3 et AF18) M: marqueur de taille (100 pb). Ligne 10: *A. flavus* NRRL 3251. Ap: *A. parasiticus* CBS 100926^T. T: témoin négatif.

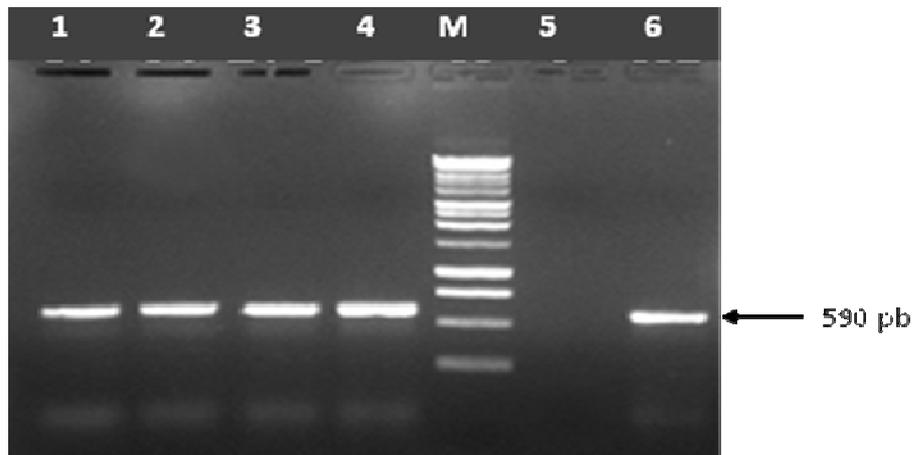


Figure 32. Profil électrophorétique des produits PCR obtenus par amplification de la région ITS1-5.8S-ITS2 de l'ADNr à partir des amorces ITS1 et ITS2 des isoalts d'*Aspergillus* section *Flavi*.

Lignes 1, 2, 3, 4: isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* (AF48, AF56, AF174 et AFB3, respectivement). M: marqueur de taille (100 pb). Ligne 5: Témoin négatif. Ligne 6: *A. flavus* NRRL 3251.

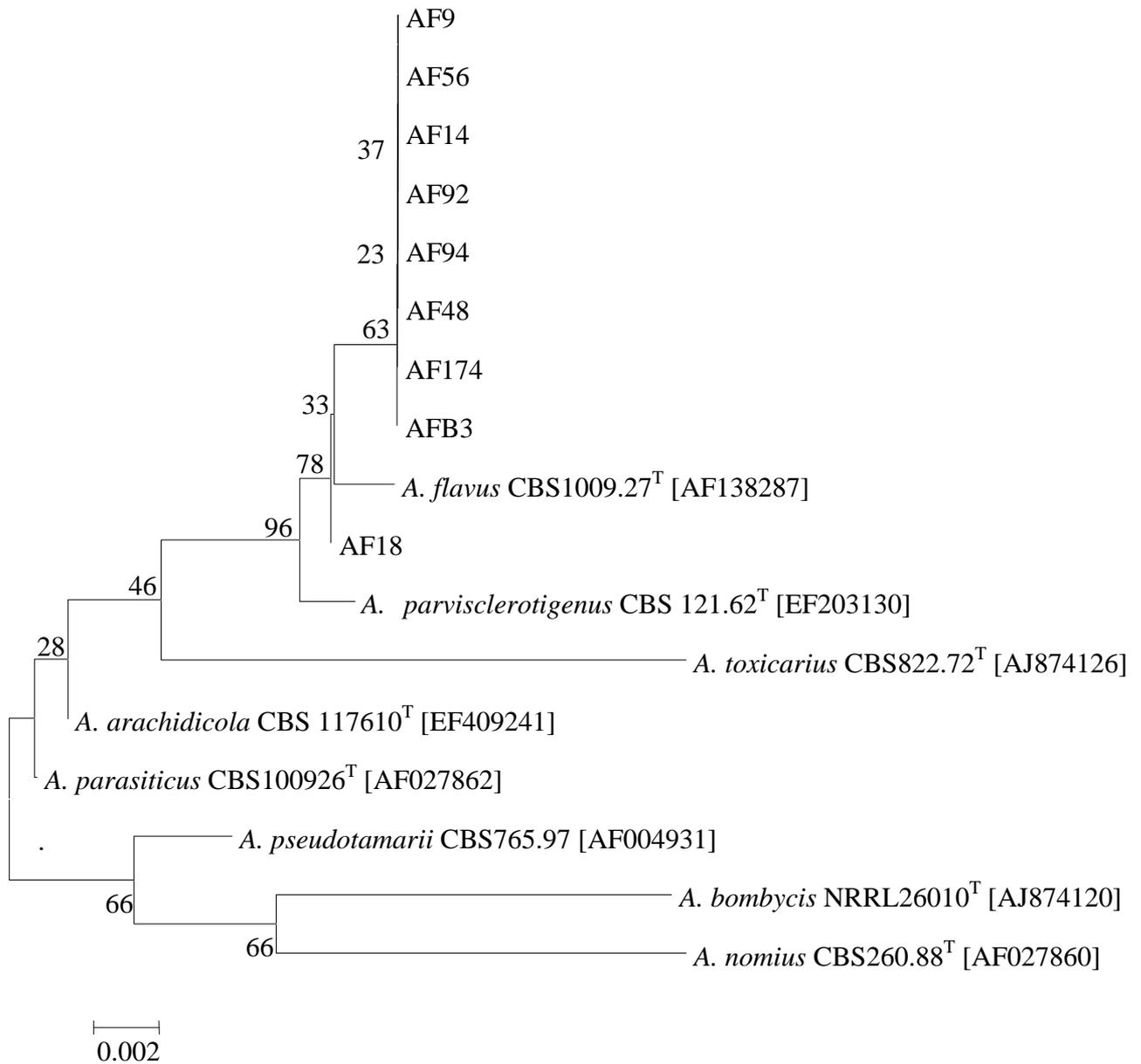


Figure 33. Arbre phylogénique basé sur l'analyse des séquences de la région ITS1-5.8S-ITS2 de l'ADNr et montrant les relations entre nos souches isolées des échantillons de blé et des souches-types des espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* productrices d'aflatoxines.

Le nombre figurant sur les nœuds indiquent les pourcentages du support « bootstrap » effectués par la méthode de « neighbour-joining ». Barre, 0,002 substitutions par nucléotide.

Les numéros d'accès à EMBL/GenBank des séquences sont donnés entre crochets.

AF18 est la seule souche qui ne soit pas aflatoxinogène.

d'*Aspergillus* section *Flavi* sont:

- 99,8% avec *A. flavus* CBS1009.27^T [AF138287];
- 99,5% avec *A. parvisclerotigenus* CBS 121.62^T [EF203130];
- 98,8% avec *A. arachidicola* CBS 1176.10^T [EF409241];
- 98,5% avec *A. parasiticus* CBS1009.26^T [AF027862];
- 97,5 avec *A. pseudotamarii* CBS765.97 [AF004931];
- 96,3% avec *A. toxicarius* CBS822.72^T [AJ874126];
- 96% avec *A. nomius* CBS260.88^T [AF027860] et *A. bombycis* NRRL26010^T [AJ874120].

La phylogénie de nos isolats établie avec les souches-types des espèces aflatoxinogènes d'*Aspergillus* section *Flavi* est illustrée dans la figure 33. Nous remarquons que nos isolats sont beaucoup plus proches d'*A. flavus* CBS1009.27^T et à un degré moindre d'*A. parvisclerotigenus* CBS 121.62^T, que des autres espèces de la section *Flavi*. Or, les souches d'*A. parvisclerotigenus* produisent de petits sclérotés (type « S ») et des aflatoxines de type B ou de 2 types B et G (Frisvad *et al.*, 2005). Par contre, les souches d'*A. flavus* produisent de grands sclérotés (type « L ») et des aflatoxines de type B uniquement. A travers ces données, ainsi que celles de la phylogénie, nous pouvons dire que les souches aflatoxinogènes AFB3, AF9, AF48, AF92, AF14, AF94, AF174 et la souche non productrice AF18 appartiennent bien à l'espèce *A. flavus*. En ce qui concerne la souche aflatoxinogène AF56, une étude plus approfondie est nécessaire pour savoir si elle appartient réellement à *A. flavus* (comme le suggère l'étude phylogénétique) ou à *A. parvisclerotigenus* (au vu de ses sclérotés de type S).

La phylogénie effectuée sur la base du séquençage de la région ITS1-5.8S-ITS2 de l'ADNr n'a pas permis de faire la distinction entre les morpho-chimiotypes présentés dans le tableau 23 (page 108). Les résultats de l'analyse moléculaire confirment donc l'hypothèse avancée dans le paragraphe II (page 106) et selon laquelle les isolats aflatoxinogènes isolés des échantillons de blé et dérivés ont une même origine et que l'espèce *A. flavus* est la principale source d'aflatoxines. Il est connu qu'*A. flavus* présente une grande diversité du point de vue morphologique et chimiotypique due probablement à une instabilité de certains de ces caractères ou à une évolution dans le temps de cette espèce. Il n'est donc pas surprenant d'avoir des isolats aussi variés phénotypiquement au sein de cette espèce. D'ailleurs, la dominance d'*A. flavus* dans les aliments a été signalée par de nombreux auteurs (Bayman et Cotty, 1991; Horn *et al.*, 1996; Cotty, 1999; Pildain *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2006).

V. Etude du pouvoir producteur d'ochratoxine A par les isolats d'*Aspergillus* et de *Penicillium*

L'étude du pouvoir de production de l'OTA a été réalisée sur milieu de culture CYA pour un total de 218 isolats appartenant au genre *Aspergillus* et *Penicillium* issus des échantillons des récoltes de 2004 et 2006.

Les résultats concernant les échantillons de la récolte de 2004 sont consignés dans le tableau 24. Parmi les 158 isolats (135 d'*Aspergillus* et 23 de *Penicillium*), 51 (32,3%) se sont révélés des producteurs d'OTA avec une limite de détection de 0,02 ng/g de milieu. Tous les isolats d'*A. alliaceus* (6) et *A. ochraceus* (10) et 8 isolats sur 10 d'*A. carbonarius* sont ochratoxinogènes. Bien que *A. niger* « aggregate » soit dominant dans les échantillons de blé analysés, seuls 7 isolats sur 25 (28%) produisent l'OTA. Les autres isolats producteurs sont *A. terreus* (5 isolats sur 10), *A. versicolor* (4 sur 22), *A. fumigatus* (2 sur 5) et *Penicillium verrucosum* (5 sur 23).

Le tableau 25 montre que l'OTA peut être produite par les isolats d'*Aspergillus* et de *Penicillium* isolés de différents échantillons de blé de source et d'origine différente (blé non stocké, blé stocké et produits dérivés). Par conséquent, cette mycotoxine peut être retrouvée dans les différents maillons de la chaîne, y compris dans le produit final (farine et semoule). Les quantités respectives d'OTA produites par *A. alliaceus* et *A. ochraceus* sont comprises entre 0,53–1,66 et 0,23–11,50 µg/g, respectivement. Celles produites par *A. carbonarius* varient de 0,01 à 9,35 µg/g. Les 7 isolats d'*A. niger* « aggregate » sont très faiblement ochratoxinogènes (0,01–0,03 µg/g). Par ailleurs, les isolats appartenant à *A. terreus*, *A. versicolor*, *Aspergillus* sp. et *Penicillium verrucosum* ont produit également des quantités d'OTA relativement faibles (0,01 à 0,12 µg/g).

Pour les échantillons de la récolte de 2006, un total de 60 isolats (50 *Aspergillus* spp. et 10 *Penicillium* spp.) a été analysé. La plupart des isolats testés appartiennent aux espèces suivantes: *A. alliaceus*, *A. ochraceus*, *A. niger* « aggregate », *A. terreus* et *Penicillium* spp (Tableau 26). La fréquence des isolats producteurs d'OTA est de 30% (18/60) dont la moitié (9) appartient à *A. niger*. Le taux d'isolats ochratoxinogènes est plus élevé dans les échantillons de la région de la Mitidja (37,5%) que ceux de la région de Sétif (21,4%) (Tableau 27). Les quantités produites sont comprises entre 0,78 et 266,46 µg/g de milieu. La quantité moyenne d'OTA produite par les isolats issus des échantillons de la Mitidja et des régions voisines est environ 4 fois plus grande que celle des isolats de la région de Sétif. Cette différence s'explique par la présence des deux isolats d'*A. alliaceus* et d'*A. ochraceus* très fortement producteurs dans un échantillon de blé tendre collecté dans la Mitidja. Les autres isolats ochratoxinogènes sont *Penicillium* sp. (2) et *A. fumigatus* (1). Les taux des isolats ochratoxinogènes pour les deux périodes (2004 et 2006) sont comparables (32,3 et

Tableau 24. Nombre et pourcentage d'isolats d'*Aspergillus* et de *Penicillium* ochratoxinogènes isolés des échantillons de 2004.

Espèce	Nombre d'isolats testés	Nombre d'isolats ochratoxinogènes (%)^a
<i>A. alliaceus</i>	6	6 (100)
<i>A. candidus</i>	5	0 (0)
<i>A. carbonarius</i>	10	8 (80)
<i>A. flavus</i>	15	0 (0)
<i>A. fumigatus</i>	5	2 (40)
<i>A. glaucus</i>	5	0 (0)
<i>A. niger</i>	25	7 (28)
<i>A. ochraceus</i>	12	12 (100)
<i>A. terreus</i>	10	5 (50)
<i>A. versicolor</i>	22	4 (18)
<i>Aspergillus</i> spp.	20	1 (5)
<i>Penicillium</i> spp.	23	5 (21,7)
Total des isolats testés	158	51 (32,3)

^aLa production a été réalisée sur milieu CYA incubé à 28°C pendant 7 jours puis analysée par HPLC.

Tableau 25. Distribution des isolats producteurs d'OTA dans les échantillons de blé et dérivés collectés en 2004 à différents stades (pré-récolte, stockage et produits finis).

Nombre d'isolats (espèces)	Source	Localité	Production d'OTA ($\mu\text{g/g}$ de CYA) ^a
<i>A. alliaceus</i>			
2	Blé de pré-récolte	Tizi Ouzou	0,86 – 1,05
2	Blé dur nettoyé	Semoulerie	0,53 – 1,02
1	Blé dur stocké	Silo Tizi Ouzou	0,62
1	Farine	Meunerie	1,66
<i>A. carbonarius</i>			
3	Son gros	Meunerie	0,02 – 0,05
2	Blé de pré-récolte	Tizi Ouzou	0,01 – 0,17
2	Blé tendre nettoyé	Meunerie	0,01 – 0,02
1	Blé dur stocké	Silo Tizi Ouzou	9,35
<i>A. fumigatus</i>			
2	Blé dur stocké	Silo Tizi Ouzou	0,02 – 0,04
<i>A. niger</i>			
2	Blé de pré-récolte	Sétif	0,03
2	Blé de pré-récolte	Tizi Ouzou	0,01 – 0,02
2	Blé dur stocké	Tizi Ouzou	0,01
1	Blé tendre nettoyé	Meunerie	0,02
<i>A. ochraceus</i>			
8	Blé dur stocké	Silos Sétif et Tizi Ouzou	0,35 – 11,50
1	Farine	Meunerie	5,67
1	Semoule	Semoulerie	3,30
1	Blé de pré-récolte	Tizi Ouzou	0,23
<i>A. terreus</i>			
1	Blé dur stocké	Sétif	0,07
2	Son gros	Semoulerie	0,01 – 0,04
1	Blé dur nettoyé	Semoulerie	0,03
1	Blé de pré-récolte	Tizi Ouzou	0,01
<i>A. versicolor</i>			
2	Blé dur stocké	Silos de Sétif et Tizi Ouzou	0,01
2	Farine	Meunerie	0,01
1	Son gros	Meunerie	0,01
<i>Aspergillus</i> sp.			
1	Semoule	Semoulerie	0,12
<i>P. verrucosum</i>			
2	Blé de pré-récolte	Sétif	0,01 – 0,02
2	Farine	Meunerie	0,01 – 0,04
1	Blé dur stocké	Silo Tizi Ouzou	0,01

^aLa production a été réalisée sur milieu CYA incubé à 28°C pendant 7 jours.

Tableau 26. Espèces fongiques ochratoxinogènes et teneurs en OTA dans les échantillons de blé de la récolte 2006 collectés dans les régions de la Mitidja et de Sétif.

Espèce fongique (Nombre d'isolats)	Origine des échantillons			Quantité d'OTA	
	Variété de blé	Localité	Région	Produite par isolat sur CYA ($\mu\text{g/g}$)	Teneur dans l'échantillon de blé ($\mu\text{g/kg}$) ^a
<i>A. ochraceus</i> (1)	BT HD 1220	Mouzaïa	Blida	216,33	21,5
<i>A. alliaceus</i> (1)	BT HD 1220	Mouzaïa	Blida	266,46	21,5
<i>A. alliaceus</i> (1)	BD Waha brut	ITGC	Sétif	34,14	15,35
<i>A. ochraceus</i> (1)	BD Waha brut	Sétif-Est	Sétif	18,24	7,8
<i>A. ochraceus</i> (1)	BTHD 1220	Mouzaïa	Blida	13,57	0,42
<i>A. niger</i> (1)	BT HDR1	Rouiba	Alger	4,85	3,65
<i>A. niger</i> (1)	BD Vitron	Ahmeur El Ain	Tipaza	5,23	5,6
<i>A. niger</i> (1)	BD MBB nettoyé	Sétif-Ouest	Sétif	19,15	ND
<i>P. verrucosum</i> (1)	BD Ghen's	Blida	Blida	4,35	ND
<i>A. ochraceus</i> (1)	BT HDR1	Rouiba	Alger	2,79	3,65
<i>A. fumigatus</i> (1)	BT Hidhab	Les Issers	Boumerdès	4,35	ND
<i>A. niger</i> (1)	BD Vitron	Boumerdès	Boumerdès	1,98	ND
<i>P. verrucosum</i> (1)	BD Waha brut	Sétif-Est	Sétif	2,23	ND
<i>A. niger</i> (1)	BD Ghen's	Mouzaïa	Blida	1,21	ND
<i>A. niger</i> (1)	BD Waha brut	Sétif-Est	Sétif	1,20	7,8
<i>A. niger</i> (1)	BD Hoggar	Rouiba	Alger	1,04	0,78
<i>A. niger</i> (1)	BT HD 1220	Mouzaïa	Blida	1,25	0,42
<i>A. niger</i> (1)	BD MBB nettoyé	Sétif-Ouest	Sétif	0,78	ND
Isolats non Producteurs (42)	BD Ghen's	Boumerdès	Boumerdès	ND	9,23

^aEchantillons de blé d'où sont originaires les espèces correspondantes de champignons.

BT: blé tendre; BD: blé dur; ND: non détecté; la limite de détection de l'OTA est de 0,02 $\mu\text{g/kg}$.

Tableau 27. Nombre et pourcentage d'isolats d'*Aspergillus* et de *Penicillium* ochratoxinogènes isolés des échantillons de blé de la récolte 2006 dans les régions de la Mitidja et de Sétif.

Région	Mitidja	Sétif	Total
Nombre d'isolats testés	32	28	60
Nombre d'isolats ochratoxinogènes (%)	12 (37,5%)	6 (21,42%)	18 (30%)
Quantités maximales et minimales d'OTA produites (µg/g)	1,04–266,46	0,78–34,1	0,78–266,46
Quantité moyenne (µg/g)	43,62	12,6	28,11

30%). En revanche les quantités produites par les isolats de 2006 sont largement supérieures à celles des isolats de 2004 (Tableaux 25 et 27). Ces différences dans la production au sein d'une même espèce ont été signalées par de nombreux auteurs.

La production d'OTA est liée à la physiologie propre de chacune des espèces et aux paramètres écologiques (température, sol, précédents culturels, précipitations et pratiques culturales) (Bayman et Baker, 2006). La production d'OTA dans les régions à climat chaud est généralement attribuée aux espèces du genre *Aspergillus*. Par contre, dans les régions à climat tempéré, c'est les espèces de *Penicillium* qui sont responsables de la production de cette toxine. Toutefois, ces deux genres peuvent être retrouvés dans les différentes denrées stockées ou dans les produits en cours de transformation (Magan et Aldred, 2005). Chez le genre *Penicillium*, deux espèces sont capables de produire l'OTA: *P. verrucosum* et *P. nordicum* (Larsen *et al.*, 2001). Cette dernière contamine souvent les produits riches en protéines et les produits fermentés à base de viande ou de fromage (Lund et Frisvard, 2003). Nos isolats du genre *Penicillium* producteurs d'OTA appartiendraient à *P. verrucosum*.

En résumé, les principales espèces impliquées dans la production d'OTA dans le blé algérien sont surtout *Aspergillus ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. carbonarius*, et à un degré moindre *A. niger*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. versicolor* et *Penicillium verrucosum*.

Les 3 premières espèces sont très connues pour leur grande capacité à produire l'OTA (Bayman *et al.*, 2002; Abarca *et al.*, 2003; Battilani *et al.*, 2003; Taniwaki *et al.*, 2003). D'après Samson *et al.* (2006), la production d'OTA chez les isolats d'*A. ochraceus* n'est pas très stable, contrairement à *A. alliaceus*. Comme nous l'avons souligné dans la partie revue bibliographique, il est très difficile morphologiquement de faire la distinction entre les espèces de la section *Circumdati*. De ce fait, il est fort probable que nos isolats désignés plus haut comme étant *A. ochraceus* appartiennent à d'autres espèces ochratoxinogènes très proches d'*A. ochraceus*. La production d'OTA par les isolats d'*A. carbonarius* rapportée dans la littérature est aussi variable (0,50 à 234 µg/g) (Bragulat *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2005). De même, le pourcentage d'isolats producteurs d'*A. niger* « aggregate » peut varier en fonction du nombre d'espèces testées ainsi que leur origine géographique (Abarca *et al.*, 1994 ; Nakajima *et al.*, 1997; Belli *et al.*, 2004). Da Rocha Rosa *et al.* (2002) et Magnoli *et al.* (2003) ont rapporté des taux de production de l'OTA de 30% et 43,1% respectivement. Les quantités produites par *A. niger* demeurent toujours inférieures à celles produites par *A. ochraceus*, *A. alliaceus* et *A. carbonarius*. Nos résultats corroborent avec ceux rapportés dans la bibliographie (Abarca *et al.*, 1994; Téren *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 2005). La production d'OTA par *A. terreus* et *A. versicolor* a été rapportée respectivement par Ueno *et al.*

(1991) et Abarca *et al.* (1997). La production d'OTA par *A. fumigatus* a été signalée par Atalla et El-Din (1993) et Abarca *et al.* (1997).

Il faut souligner que la capacité de production *in vitro* par certaines souches ne traduit pas obligatoirement les mêmes capacités *in vivo*. En effet, il peut y avoir de souches capables de produire la mycotoxine dans les conditions naturelles mais pas dans les conditions de laboratoire et inversement (Mantle, 2002; Medina *et al.*, 2005). Cette hypothèse peut d'ailleurs expliquer, en partie, l'absence de corrélation entre le taux des isolats mycotoxinogènes et la présence de la mycotoxine dans une denrée comme cela a été observé dans notre cas.

VI. Contamination des échantillons de blé et dérivés par l'aflatoxine B1 et l'ochratoxine A

L'analyse par HPLC de l'AFB1 et de l'OTA a été réalisée pour 53 échantillons, dont 30 échantillons de blé et dérivés collectés en 2004 et 23 échantillons de blé de la récolte de 2006. Le taux de contamination global par les deux mycotoxines est présenté dans le tableau 28 et la figure 34. Des chromatogrammes de 2 échantillons de blé contaminés par l'AFB1 et l'OTA sont présentés dans les figures 35 et 36. Nous remarquons que le nombre d'échantillons contaminé par l'AFB1 est supérieur au nombre de ceux contaminés par l'OTA. En effet, 56,6% des échantillons sont contaminés par l'AFB1, alors que le taux moyen de contamination par l'OTA n'est que de 35,8%. Les taux de contamination des échantillons des récoltes de 2004 et 2006 sont respectivement de 53,3 et 60,9% pour l'AFB1 et de 40 et 30,4% pour l'OTA. Pour les échantillons de blé de la récolte de 2006, le taux de contamination par l'AFB1 est comparable dans les régions de la Mitidja et de Sétif (61,5 et 60% respectivement). Le nombre d'échantillons contaminés par l'OTA est plus élevé dans la région de la Mitidja que celle de Sétif (46,2 et 10% respectivement) (Figure 37). Sur les 30 échantillons contaminés par l'AFB1, cinq (13,3%) présentent des teneurs supérieures à la norme européenne qui est de 5 µg/kg et 2 présentent des teneurs supérieures à la norme algérienne, laquelle est de 10 µg/kg.

1. Contamination des échantillons de blé et dérivés par les aflatoxines

Les teneurs en AFB1 dans les échantillons de blé stockés et non stockés de la récolte 2004 varient de 0,13 à 37,42 µg/kg (Tableau 29). Les échantillons collectés au niveau de la CCLS de Tizi Ouzou issus des récoltes de la région de la Mitidja et des régions voisines (Alger, Boumerdès et Tizi Ouzou) présentent généralement des teneurs plus élevées en AFB1 que ceux provenant de la région de Sétif. En effet, les teneurs en AFB1 sont inférieures à 1 µg/kg (0,13 et 0,87 µg/kg) pour les échantillons collectés à Sétif et supérieures à 1 µg/kg, dans leur majorité, dans les échantillons de la

Tableau 28. Résultat global du taux de contamination par l'AFB1 et l'OTA des 53 échantillons de blé et dérivés collectés en 2004 et en 2006 dans les régions de la Mitidja et de Sétif.

Echantillons		Mycotoxine	
		AFB1	OTA
Echantillons de 2004	Nombre d'échantillons contaminés/total (%)	16/30 (53,3%)	12/30 (40%)
	Nombre d'échantillons > à 5 µg/kg	1	1
Echantillons de 2006	Nombre d'échantillons contaminés/total (%)	14/23 (60,9%)	7/23 (30,4%)
	Nombre d'échantillons > à 5 µg/kg	4	4
Nombre d'échantillons contaminés/ total des échantillons analysés (%)		30/53 (56,6%)	19/53 (35,8%)
Nombre total d'échantillons dépassant la norme de 5 µg/kg (Normes Européenne) (%)		5 (16,7%)	5 (26,3%)
Nombre total d'échantillon dépassant la norme de 10 µg/kg (Normes Algériennes) (%)		2 (6,7%)	Norme non définie

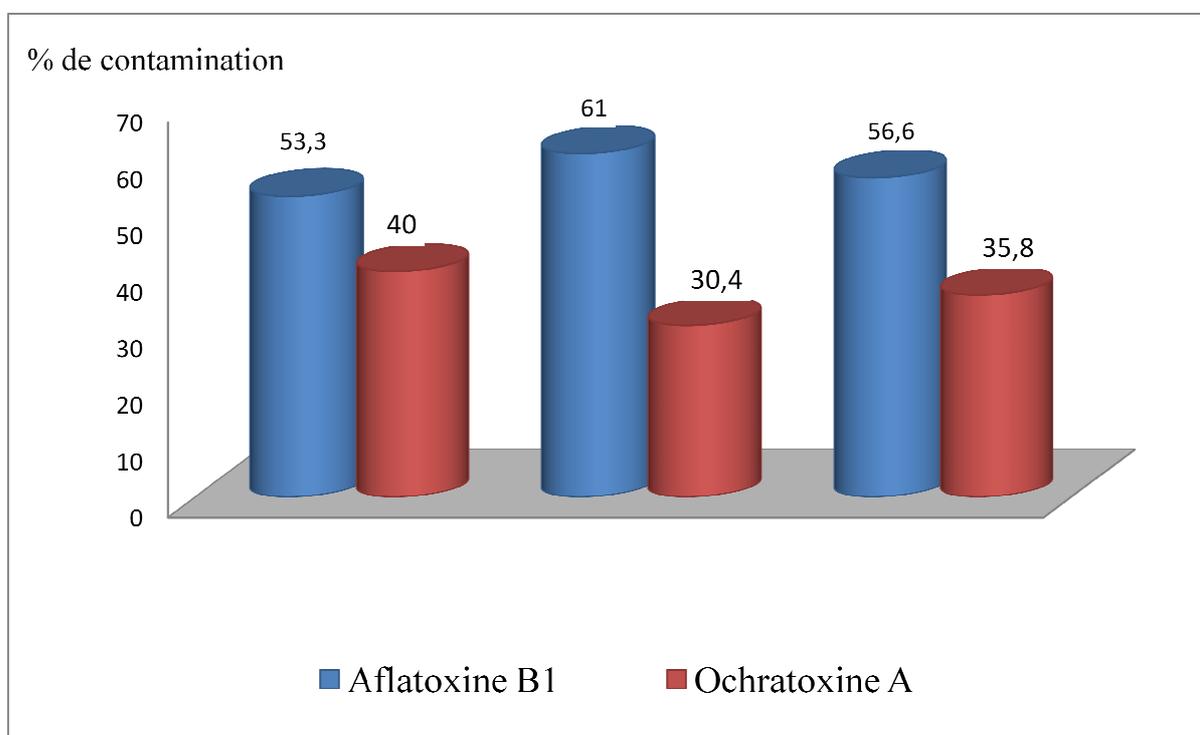
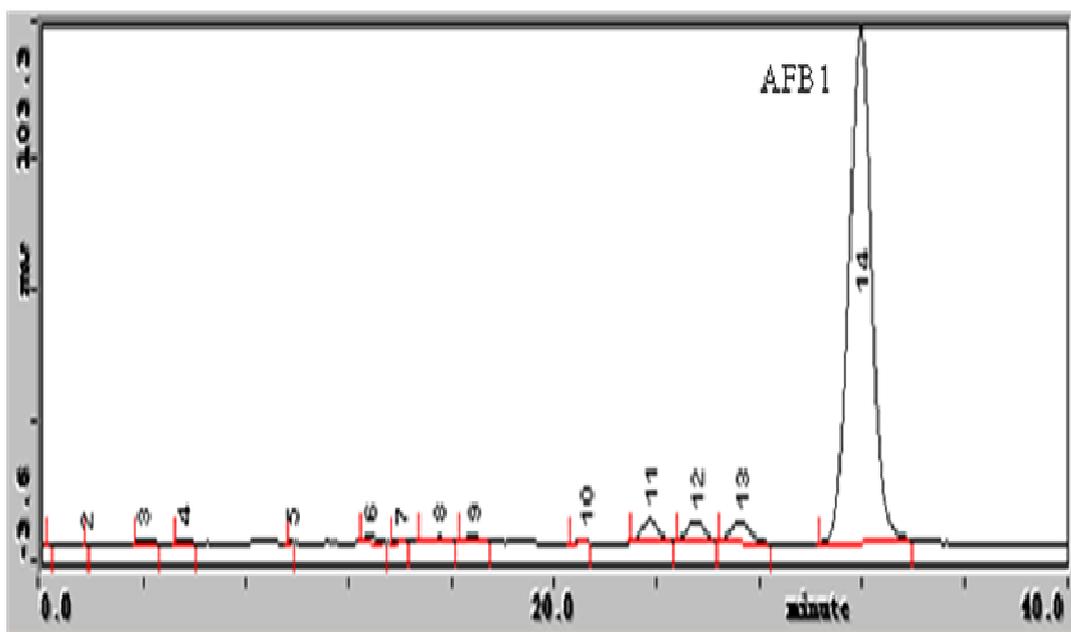


Figure 34. Résultat global du taux de contamination par l'AFB1 et l'OTA des échantillons de blé de la récolte 2004 et 2006 prélevés dans les régions de la Mitidja et de Sétif.



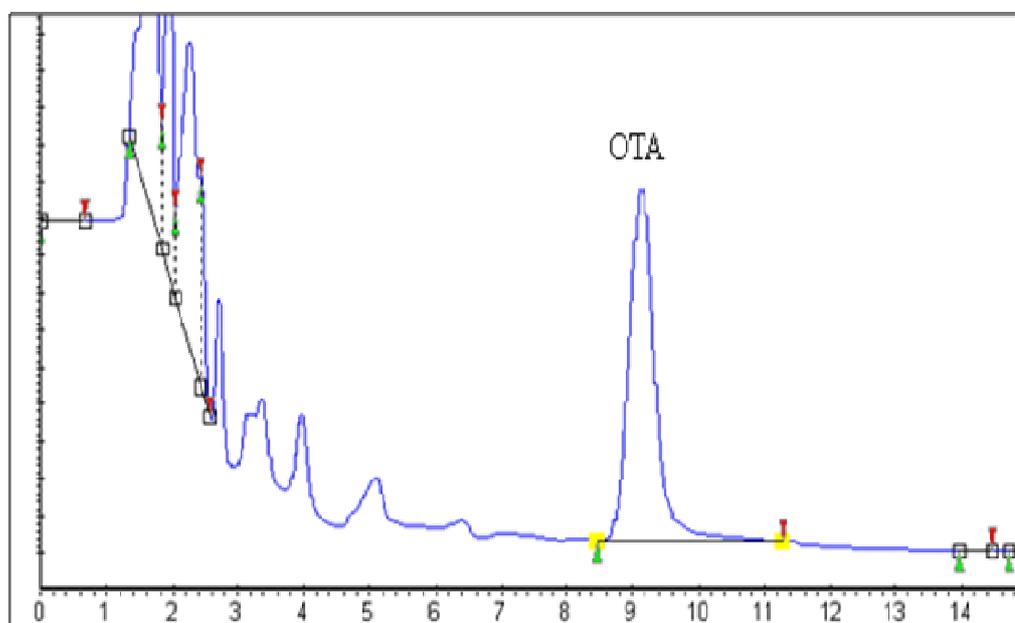
Programme HPLC pour l'analyse de l'AFB1:

Phase mobile composée de méthanol-acétonitrile-eau (20:20:60 v/v) + (119 mg de KBr + 350 µl de HNO₃ 4M).

Débit: 0,5 ml/min. Pression: 28-30 mPa. Volume d'injection: 20 µl. λ ex. 362 nm; λem. 425 nm.

L'analyse est réalisée en condition isocratique.

Figure 35. Chromatogramme d'un échantillon de blé contaminé par l'AFB1.



Programme HPLC pour l'analyse de l'OTA:

Phase mobile composée d'acétonitrile-eau-acide acétique (57:41:2 v/v).

Débit: 1 ml/min. Pression: 80-90 mPa. Volume d'injection: 80 µl. λ ex. 333 nm; λem. 466 nm.

L'analyse est réalisée en condition isocratique.

Figure 36. Chromatogramme d'un échantillon de farine contaminé par l'OTA.

région de la Mitidja. Les plus fortes concentrations (1,69–37,42 µg/kg) ont été retrouvées surtout dans les échantillons de blé stockés durant 12 mois. Or, ces échantillons sont les plus contaminés par *A. flavus* (40,7%). Bien que la contamination par *A. flavus* des échantillons provenant de Sétif soit aussi importante (25,7 et 32%), les quantités d'AFB1 détectées sont relativement faibles. Ces niveaux faibles observés peuvent s'expliquer par le climat sec, moins favorable à la production d'aflatoxines.

L'incidence de la contamination des échantillons de blé collectés au niveau des deux unités de transformation de blé (meunerie et semoulerie) semble moins importante, puisque 2 échantillons sur 8 ont révélé la présence d'AFB1. Un échantillon de son gros issu de la transformation de la farine en contient 3,37 µg/kg, et un autre de la semoule, 1,18 µg/kg (Tableau 30).

Le résultat global du niveau de contamination par l'aflatoxine B1 et l'OTA des échantillons de la récolte de 2006 est illustré dans le tableau 31. Les taux de contamination des échantillons de la Mitidja et des régions voisines et la région de Sétif sont respectivement de 61,5 et 60% pour l'AFB1 et de 46,1 et 10% pour l'OTA. Les teneurs en AFB1 et en OTA dans les différents échantillons positifs sont présentés dans le tableau 32. Parmi les 4 échantillons dont les teneurs dépassent la norme, un provient de la localité de Boumerdès et les 3 autres de la région de Sétif. L'échantillon de blé dur (var. Ghen's) prélevé à Boumerdès contient 13,96 µg/kg d'AFB1 (et aussi 9,23 µg/kg d'OTA).

Très peu de travaux ont été rapportés sur la contamination du blé par les *Aspergillus* aflatoxinogènes et par les aflatoxines, car la majorité des pays grands producteurs de blé dans le monde sont situés dans les régions à climat tempéré dans lesquelles ce champignon n'a peu ou pas d'impact significatif. En effet, la majorité des publications ont été consacrées à la contamination du maïs et du riz cultivés surtout dans les climats chauds. Les quelques résultats rapportés sur la contamination du blé par les aflatoxines concernent des échantillons de blé et dérivés collectés aux niveaux des commerces. Par conséquent, peu d'informations sont disponibles sur l'origine géographique du blé analysé et ses conditions de stockage. Il est donc très difficile de faire des comparaisons avec certaines données bibliographiques.

A titre d'exemple nous présentons dans le tableau 33 quelques résultats relatifs aux teneurs en aflatoxines dans quelques céréales. Nous remarquons que les teneurs en aflatoxines varient considérablement en fonction du pays d'origine et du type de céréales. Ainsi, l'incidence des aflatoxines dans les farines de maïs et de blé commercialisées au Maroc est de 80 et 17,6%

Tableau 29. Détection de l'aflatoxine B1 et de l'OTA dans les échantillons de blé de la récolte 2004 collectés au champ et stockés dans le silo dans les régions de Sétif et de Tizi Ouzou.

Origine Source	Région de Sétif		Boumerdès	CCLS de Tizi Ouzou	
	Champ	Silo 1	Champ	Silo 2	Silo 3
Aflatoxine B1					
Nombre d'échantillons analysés	2 ^a	6 ^b	3 ^a	6 ^b	5 ^b
Nombre d'échantillons positifs	1	2	2	5	4
AFB1 (µg/kg)	0,87	0,13; 0,44	1,35; 3,41	0,31–4,62	1,69–37,42
Ochratoxine A					
Nombre d'échantillons analysés	2 ^a	6 ^b	3 ^a	6 ^b	5 ^b
Nombre d'échantillons positifs	1	3	2	3	1
OTA (µg/kg)	0,76	0,21 –1,6	0,45; 1,65	1,2 –3,91	1,74

^aChaque échantillon est constitué d'un mélange de 10 échantillons prélevés dans une parcelle d'un hectare selon le plan de prélèvement décrit dans la partie matériel et méthodes.

^bChaque échantillon représente une cellule de stockage.

Tableau 30. Détection de l'aflatoxine B1 et de l'OTA dans les échantillons de blé collectés au niveau de la meunerie et de la semoulerie dans la région de Tizi Ouzou.

Origine Source	Meunerie (blé tendre)				Semoulerie (blé dur)			
	Blé tendre	Blé nettoyé	Farine	Son	Blé dur	Blé nettoyé	Semoule	Son
Nombre d'échantillons analysés	1 ^a	1	1	1	1	1	1	1
Nombre d'échantillons positifs	0	0	1	1	0	0	1	1
AFB1 (µg/kg ⁻¹)	ND	ND	ND	3,37	ND	ND	1,18	ND
OTA (µg/kg)	ND	ND	41,55	ND	ND	ND	ND	3,33

^aChaque échantillon est constitué d'un mélange de 3 sous-échantillons prélevés selon le protocole décrit dans la partie matériel et méthodes.

ND: non détectée; la limite de détection de l'AFB1 est de 0,005 µg/kg et celle de l'OTA, 0,02 µg/kg.

Tableau 31. Résultat global du niveau de contamination par l'aflatoxine B1 et l'OTA des échantillons de blé de la récolte 2006 collectés un mois après la moisson, dans les régions de la Mitidja et de Sétif.

Région	Mitidja	Sétif	Total
Nombre d'échantillons Analysés	13 ^a	10	23
Aflatoxine B1			
Nombre d'échantillons positifs (%)	8 (61,5%)	6 (60%)	14/23 (60,9%)
Teneur en µg/kg	0,22–13,96	0,21–7,0	0,21– 13,96
Ochratoxine A			
Nombre d'échantillons positifs (%)	6 (46,1%)	1 (10%)	7/23 (30,4%)
Teneur en µg/kg	0,42–21,5	15,35	0,42– 21,5

^aChaque échantillon est constitué d'un mélange de 3 sous-échantillons prélevés selon le protocole décrit dans la partie matériel et méthodes.

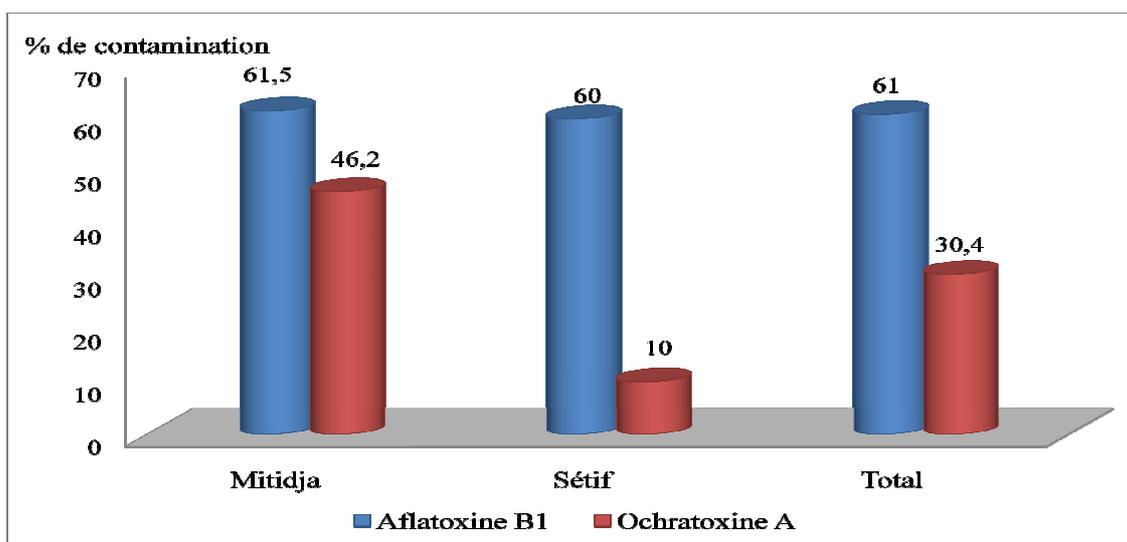


Figure 37. Taux de contamination global par l'AFB1 et l'OTA des échantillons de blé de la récolte 2006 prélevés dans les régions de la Mitidja et de Sétif.

Tableau 32. Détection de l'aflatoxine B1 et de l'OTA dans les échantillons de blé de la récolte de 2006 collectés dans les régions de la Mitidja et de Sétif.

Région	Mitidja et régions voisines (13) ^a						Sétif (10) ^b			
Localité	Blida	Mouzaïa	Tipaza	Rouiba	Boumerdès	Tizi Ouzou	Est ^c	Ouest ^c	Nord ^c	ITGC ^d
Nombre d'échantillons/localité	1	3	1	3	2	3	3	2	1	4
Aflatoxine B1 (µg/kg)	ND	0,15–2,39	0,56	0 – 1,02	2,95 ; 13,96	0–0,22	0–1,4	2,25 ; 5,26	7,0	0–6,12
Ochratoxine A (µg/kg)	ND	0–21,15	5,6	0– 3,65	0 ; 9,23	0–1,23	ND	ND	ND	0–15,35

^aNombre total d'échantillons collectés, durant le mois d'Août, au niveau de la CCLS de Blida.

^bNombre total d'échantillons collectés, durant le mois d'Août, au niveau de la CCLS de Sétif.

^cPosition par rapport à la ville de Sétif.

^dEchantillons prélevés au niveau de la station expérimentale de l'Institut Technologique des Grandes Cultures (ITGC) situé du côté ouest de Sétif.

ND: non détectée, la limite de détection de l'AFB1 est de 0,005 µg/kg et celle de l'OTA, 0,02 µg/kg.

Tableau 33. Exemples des niveaux de contamination de quelques céréales par les aflatoxines rapportés dans la bibliographie.

Pays	céréale	Toxine	Teneur (µg/kg)	Références
Algérie	Blé	AFB1	0,13 à 37,42	Nos résultats.
Maroc	Blé	AFB1	0,03 à 0,15	Zinedine <i>et al.</i> (2007).
	Maïs	AFB1	0,23 à 11,2	
Argentine	Maïs	AFB1	50	Nepote <i>et al.</i> (1997).
		AFB2	30	
Brésil	Maïs	AFB1	0,2–129	Vargas <i>et al.</i> (2001).
Corée	Riz	AFB1	4,3	Park <i>et al.</i> (2005).
Etats Unis	Maïs	Aflatoxines totales	0–35	Abbas <i>et al.</i> (2002).
Ethiopie	Blé	AFB1	26	Ayalew <i>et al.</i> (2006).
France	Maïs	AFB1	4–34	Garon <i>et al.</i> (2006).
Inde	Maïs	AFB1	0–26,8	Janardhana <i>et al.</i> (1999).
Turquie	Blé	AFB1	0,03–0,21	Baydar <i>et al.</i> (2005).

respectivement (Zinedine *et al.*, 2007a) et les plus fortes quantités sont retrouvées dans la farine de maïs.

L'absence de corrélations entre l'incidence de contamination par les espèces aflatoxinogènes et les teneurs en aflatoxines dans les échantillons a été signalée (Russel et Paterson, 2007; Tabouc, 2007). Ainsi, ces champignons ont été isolés pratiquement à des niveaux élevés dans les différentes céréales analysées en Espagne, dont les taux de contamination atteignent parfois 100% dans le blé et le maïs. Cependant, les aflatoxines n'ont pas été détectées dans ces échantillons (Jimenez *et al.*, 1991). La présence d'isolats aflatoxinogènes dans le blé de pré-récolte des différentes régions d'Égypte a été signalée (El-Kady et El-Maraghy, 1994). D'autres investigations ont permis d'isoler des membres d'*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* et *A. versicolor* (Atalla *et al.* 1999) et de détecter la présence des 4 types d'aflatoxines (B1, B2, G1 et G2) et d'OTA dans le blé.

Du fait de ses caractéristiques physiologiques (croissance à température élevée), le groupe d'*A. flavus* est très répandu dans les régions à climat chaud et occupe des niches écologiques très diverses (Wilson *et al.*, 2002). Des isolats aflatoxinogènes appartenant particulièrement à *A. flavus* sont parmi les champignons toxigènes retrouvés dans les céréales dans les régions méditerranéennes (Logrieco *et al.*, 2003). En effet, les changements dans les conditions climatiques, caractérisés par des étés exceptionnellement chauds, comme en 2003, dans certains pays méditerranéens (Italie, Espagne, Grèce..) a conduit à la contamination exceptionnelle des céréales par les aflatoxines (Pietri *et al.*, 2004; Giorni *et al.*, 2007).

Il semble que les *Aspergillus* aflatoxinogènes seraient constitués par une mosaïque d'espèces appartenant à différents clades qui se développent dans des niches écologiques diverses dans les climats chauds (Cotty, 1997). En dépit de cette grande diversité de niches écologiques qu'occupent les *Aspergillus* aflatoxinogènes, il est généralement admis que le principal réservoir de ces champignons sont les sols cultivés (Horn *et al.* 1996; Horn et Dorner, 1999). Les sclérotés servent dans ce cas comme propagules d'infection dans le sol (Bayman et Cotty, 1991) et contaminent diverses variétés de récoltes par contact direct (ex. les arachides) ou à travers une dispersion par le vent ou les insectes (ex. graines de céréales) (Lillehoj *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1986). Les insectes endommagent l'enveloppe des grains, ce qui favorise la pénétration de l'inoculum à l'intérieur. Pour le maïs, naturellement contaminé par des teneurs élevées en AFB, la toxine se retrouve dans les fractions du germe et de l'enveloppe, mais la répartition varie en fonction du taux de contamination. Dans le gruau et la farine, qui ne contiennent que peu de matières grasses, on retrouve seulement 6 à 10% d'AFB1 (Lopez-Garcia *et al.*, 1999).

2. Contamination du blé et dérivés par l'OTA

Le résultat global de la contamination par l'OTA des échantillons de blé et dérivés des récoltes de 2004 et 2006 est présenté dans le tableau 28 et la figure 37. Les résultats détaillés sont consignés dans les tableaux 29, 30 et 32. Le rendement d'extraction pour l'OTA varie entre $65,3 \pm 6,4\%$ à $72,8 \pm 10,4\%$. Ces sont considérés comme satisfaisants si on les compare à ceux rapportés dans la bibliographie. En effet, des taux de rendement compris entre $72,3 \pm 3,2\%$ à $76,1 \pm 5,7\%$ ont été obtenus par Molinie *et al.* (2005) et El Adlouni *et al.* (2006) qui ont utilisé la même méthode d'extraction. Sur les 53 échantillons analysés, 19 sont contaminés, soit un taux de 35,8%. Les taux de contamination respectifs des échantillons collectés en 2004 et en 2006 sont de 40 et 30,4%. La moitié des échantillons de blé (4/8) de la récolte de 2004, collectée dans la région de Sétif, est contaminée par l'OTA (0,21 à 1,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$), alors qu'un seul échantillon de la récolte de 2006 sur les 10 analysés a révélé la présence d'OTA (15,35 $\mu\text{g}/\text{kg}$). En revanche, les échantillons de la récolte de 2006 provenant de la Mitidja et des régions voisines (Alger, Blida, Boumerdès et Tizi Ouzou) révèlent un taux de contamination de 46,2%.

Les 18 isolats ochratoxinogènes de la récolte de 2006 ont été isolés de 6 sur les 7 échantillons de blé contaminés par l'OTA (Tableau 26). L'échantillon de blé tendre (HD1220) provenant de la localité de Mouzaïa (Blida) et les deux échantillons de blé dur (Waha) provenant de deux localités de Sétif (Sétif-Est et ITGC de Sétif) contiennent les teneurs les plus élevées en OTA (21,5; 15,35 et 7,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivement). Ceci coïncide avec la présence d'*A. alliaceus* et *A. ochraceus*, les plus fortement productrices d'OTA (13,57 à 216,33 $\mu\text{g}/\text{g}$ de milieu) dans ces échantillons (Tableau 26). Seul l'échantillon de blé dur (var. Ghen's) provenant de la région de Boumerdès dont la teneur en OTA est de 9,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ne présentait pas d'isolats ochratoxinogènes. L'absence du champignon responsable de la production d'OTA dans cet échantillon serait vraisemblablement lié à un stress ayant provoqué sa disparition.

En outre, nos résultats ont montré que cette mycotoxine a été détectée dans les échantillons d'origine et de sources différentes (grains de blé stockés et non stocké, farine et son gros) (Tableaux 29, 30 et 32). Le taux de contamination des échantillons de la récolte de 2004 (40%) est légèrement supérieur à celui de la récolte de 2006 (30,4%). Toutefois, les teneurs en OTA dans les échantillons de 2006 sont relativement plus élevées.

Les données bibliographiques sur la contamination des céréales par l'OTA sont très variées (Petzinger et Weindenbach, 2002). Certains auteurs signalent la présence d'OTA dans les échantillons de grains de céréales à des teneurs supérieures à la norme (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Czerwiecki, *et al.*, 2002; Abdulkadar *et al.*, 2004). D'autres mentionnent l'absence de cette mycotoxine dans les

graines de céréales (Malmauret *et al.*, 2002; Rizzo *et al.* 2002; Blesa *et al.*, 2004). La présence de l'OTA dans les graines dépend essentiellement des conditions de récolte, de séchage et de stockage. En outre, des variations annuelles dans les taux et les niveaux de contamination des céréales (blé, orge et maïs) ont été observées par plusieurs auteurs (Jurcevic *et al.*, 1999; Scudamore, 1999; Rizzo *et al.* 2002; Blesa *et al.*, 2004).

D'après SCOOP (Task 3.2.7, European 2002), les données concernant la fréquence et le taux de contamination en OTA de plusieurs aliments, montrent que cette toxine est retrouvée dans divers aliments, particulièrement les céréales, avec un taux avoisinant les 50 % (blé: 28%). Il semblerait que près de 75% de l'OTA ingérée par l'homme a pour origine le blé (Canadas, 2006). Zinedine *et al.* (2006) rapportent un taux de contamination par l'OTA de 40% du blé commercialisé au Maroc. D'après une étude réalisée au Danemark, sur 520 échantillons de blé, le taux de contamination est de 32% avec des concentrations allant de 0,05–51 µg/kg (Pittet, 1998). Ces taux de contamination sont proches des résultats que nous avons obtenus.

La teneur en OTA dans les différents produits céréaliers est sous l'influence de nombreux facteurs biotiques et abiotiques composant « l'écosystème » du grain. En effet, les teneurs en OTA rencontrées sont variables et peuvent aller de quelques ng/kg (à la limite de la quantification), à plusieurs µg/kg. Les quantités d'OTA détectées dans nos échantillons varient de 0,21 à 41,55 µg/kg. Un échantillon de farine (41,55 µg/kg) et 4 échantillons de blé de la récolte 2006 présentaient des teneurs supérieures à la norme établie par l'Union Européenne (5 µg/kg) (Commission Regulation EC, 2002).

Il est fort probable que la forte contamination de l'échantillon de farine (41,55 µg/kg) soit liée à la température exceptionnellement élevée de l'entrepôt (36°C) et à la nature de la flore fongique composée de 95% du genre *Aspergillus* dont *A. niger* (22%) et *A. alliaceus* (16%), cette dernière étant fortement productrice d'OTA. L'influence du processus de transformation sur les teneurs en OTA dans les produits finis n'est pas bien élucidée (Murphy *et al.*, 2006). De nombreuses publications indiquent que les mycotoxines peuvent se retrouver dans la farine ou les autres produits dérivés des céréales (pâtes, semoules, céréales, etc.) (Solfrizzo *et al.*, 2001; Schollenberger *et al.*, 2002; Shepard *et al.*, 2002). Pendant la transformation des céréales, de nombreux paramètres vont entrer en jeu et modifier le taux des mycotoxines. En général, la plus forte quantité de mycotoxines se trouve dans la périphérie du grain et de ce fait l'élimination des débris de grains réduira la contamination (Chelkowski *et al.*, 1981; Lopez-Garcia *et al.*, 1999; Schollenberger *et al.*, 2002). Le nettoyage du blé (élimination du péricarpe) avant mouture diminue le taux d'OTA de trois fois aussi bien dans le blé dur que dans le blé tendre (Osborne *et al.*, 1996). Comme la majorité des mycotoxines, l'OTA est relativement résistante à la chaleur (Van der Stegen *et al.*, 2001). Selon

Scott (1996), l'OTA n'est pas éliminée lors du processus de nettoyage du grain et est distribuée à quantité égale dans la farine et le son de blé.

VII. Influence de la température, de l'activité de l'eau et du milieu de culture sur la croissance et la production de l'aflatoxine B1 par la souche AF 92 d'*A. flavus*

Le choix porté sur *A. flavus* et la production de l'AFB1 est justifié par l'importance des espèces d'*A. flavus* et de la production de l'AFB1 dans les échantillons analysés. De plus, l'influence de la température, de l'activité de l'eau et du milieu de culture sur la croissance et la production de l'AFB1 a été très peu étudiée contrairement à *A. ochraceus* et à la production de l'OTA. A ce titre la souche AF92 d'*A. flavus* (isolée d'un échantillon de blé tendre, variété Hidhab) et qui s'est révélée une bonne productrice d'AFB1(200 µg/g de milieu CYA) a été retenue pour cette étude.

1. Influence sur la croissance de la souche AF92 d'*A. flavus*

Les résultats obtenus montrent que la croissance mycélienne de la souche AF 92 d'*A. flavus* est favorisée par les températures de 25 et 30°C et par les activités de l'eau (a_w) de 0,95 et 0,99. Par contre, la croissance est réduite de manière significative ($p < 0,05$) par les faibles a_w et les températures de 20°C et 37°C (Tableau 34; Figure 38). La vitesse de croissance est plus élevée dans le milieu CYA que dans le milieu à base d'extrait de blé aux faibles activités de l'eau (0,85 et 0,90) pour les 4 températures. Par contre, elle est comparable dans les deux milieux à une $a_w = 0,99$ pour les 4 températures. Les vitesses de croissance maximales sont observées dans le milieu CYA incubées à 30°C pour les a_w de 0,90; 0,95 et 0,99. A cette température, les vitesses de croissance (11,84; 12,1 et 11) ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$). Le facteur limitant d'une manière très significative la croissance est l'action combinée de la température basse et de l'activité de l'eau faible (20°C et 0,85). En effet, à 20°C et à une a_w de 0,85, la vitesse de croissance ne dépasse pas 1,67 mm/j sur milieu CYA et 0,9 mm/j sur milieu extrait de blé. A 37°C, la croissance est très ralentie aux a_w de 0,85, 0,90 et 0,95, alors qu'elle est relativement plus élevée à une a_w de 0,99.

2. Influence sur la production d'AFB1 par la souche AF92 d'*A. flavus*

Les résultats de l'étude de l'influence de l'interaction de la température, de l'activité de l'eau et du milieu de culture sur la production d'AFB1 par *A. flavus*, montrent que les quantités d'AFB1 produites après 21 jours d'incubation varient considérablement en fonction de la température, de l'activité de l'eau et du milieu de culture (Figure 39). Au 7^e jour, les quantités produites sont relativement faibles puis augmentent avec le temps d'incubation (Tableau 35). Les quantités les plus élevées sont obtenues entre le 15^{ème} et le 21^{ème} jour d'incubation. Les quantités produites sur milieu

CYA et sur milieu extrait de blé varient respectivement de 0,2 à 56,7 $\mu\text{g/g}$ et de 0,2 à 9,2 $\mu\text{g/g}$ (Tableau 35, Figure 40 et 41). Il faut signaler que le milieu CYA permet une production d'une masse mycélienne beaucoup plus élevée que le milieu extrait de blé (l'AFB1 produite sur CYA est donc très supérieure à celle produite dans le milieu à l'extrait de blé). La production optimale est observée après 21 jours d'incubation aux températures de 25 et 30°C pour des a_w de 0,95 et 0,99. Les quantités respectives produites sont 34,56; 45,6; 46,28 et 56,5 $\mu\text{g/g}$. A une a_w de 0,85, correspondant à une humidité relative de 18-20% pour le blé, la production de l'AFB1 n'est pas complètement inhibée, mais elle demeure beaucoup moins élevée par rapport aux a_w de 0,95 et 0,99. Pour une a_w de 0,90 (soit 21-22% d'humidité relative), les quantités d'AFB1 produites sont à peu près deux fois plus élevées à celles produites à une a_w de 0,85. D'une manière générale, les deux paramètres, température et activité de l'eau, sont des facteurs déterminants dans la production de l'AFB1. Mais, il suffit que l'un des 2 paramètres soit favorable pour que la souche produise des quantités non négligeables.

La température et l'humidité sont les deux facteurs qui exercent une influence considérable sur la croissance et la production de mycotoxines (Mitchell *et al.*, 2004). Les valeurs caractéristiques du facteur d'humidité qui sont nécessaires pour permettre le développement des moisissures s'échelonne de 0,70 à 0,99, le facteur d'humidité et la propension au développement des moisissures augmentant avec la température (FAO/IAEA, 2002). Le maïs, par exemple, peut se conserver relativement bien pendant un an dans une humidité relative de 15% et à une température de 15°C. Stocké à 30°C, le même maïs sera sévèrement détérioré par des moisissures en l'espace de trois mois.

Les nombreuses publications consacrées à l'influence de l'interaction de la température et de l'activité l'eau sur la toxinogénèse ont porté sur de la production de l'OTA (Ramos *et al.*, 1998; Taniwaki *et al.*, 2001; Pardo *et al.*, 2005; Kouadio *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2007). Cependant, peu de références mentionnent l'influence de ces deux facteurs sur *A. flavus* et la production des aflatoxines (Arrus *et al.*, 2005). Toutefois, la plupart des auteurs mentionnent une croissance et une production optimale de mycotoxines aux températures voisines de 30°C et aux activités de l'eau supérieures à 0,95.

La toxinogénèse dépend fortement de la disponibilité en eau (a_w) et elle n'a lieu que pour une a_w légèrement supérieure à l' a_w minimale pour la croissance (Le bars, 1982; Ramos *et al.*, 1998; Pardo *et al.*, 2004a,b). Ceci a été confirmé par l'ensemble des résultats obtenus dans le cas présent. Dans les conditions optimales, la concentration en toxine augmente d'une manière exponentielle en fonction de l' a_w .

Tableau 34. Influence de l'activité de l'eau (a_w) et de la température sur la vitesse de croissance radiale (mm/jour) de la souche AF92 d'*A. flavus* sur milieux CYA et extrait de blé*.

Température		20°C		25°C		30°C		37°C	
Milieu		CYA	Extrait de blé	CYA	Extrait de blé	CYA	Extrait de blé	CYA	Extrait de blé
Activité de l'eau (a_w)	0,85	1,67 ± 0,6 ^{b(**)}	0,9 ± 0,2 ^a	4,15 ± 0,7 ^d	1,6 ± 0,4 ^b	9,8 ± 0,6 ^f	4,4 ± 0,8 ^d	2,9 ± 0,8 ^d	1,33 ± 0,2 ^b
	0,9	3,3 ± 0,2 ^d	1,31 ± 0,08 ^b	7,88 ± 1,6 ^f	2,3 ± 0,6 ^c	11,84 ± 0,8 ⁱ	5,4 ± 1,6 ^e	4,3 ± 0,6 ^e	1,43 ± 0,06 ^b
	0,95	3,31 ± 0,2 ^d	3,17 ± 0,1 ^d	9,31 ± 0,8 ^g	9,76 ± 1,9 ^g	12,1 ± 1,9 ⁱ	10 ± 1,4 ^g	3,9 ± 0,4 ^e	2,47 ± 0,08 ^d
	0,99	4,08 ± 0,1 ^e	4,11 ± 0,07 ^e	10,36 ± 1,8 ^h	10,8 ± 2,0 ^h	11 ± 0,8 ⁱ	8,37 ± 0,8 ^f	ND	ND

* Les résultats exprimés dans le tableau sont les moyennes de 3 répétitions suivies de l'écart-type.

** Les valeurs affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (test de Student-Fisher).

ND : non déterminé.

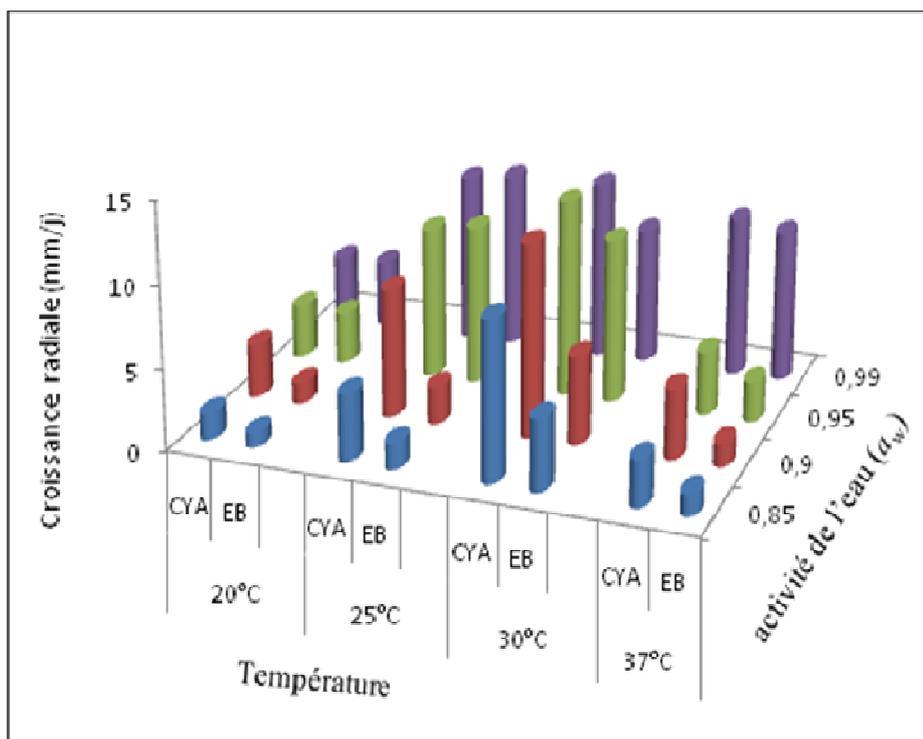


Figure 38. Influence de l'activité de l'eau (a_w) et de la température sur la vitesse de croissance radiale (mm/jour) de la souche AF92 d'*A. flavus* sur milieux CYA et extrait de blé.

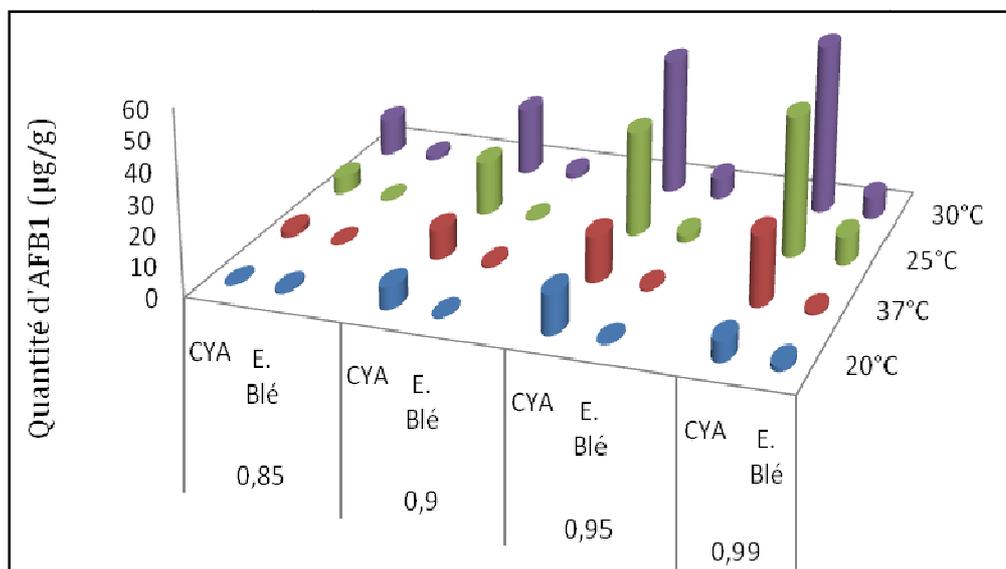


Figure 39. Influence de l'activité de l'eau (a_w) et de la température sur la production de l'AFB1 par la souche AF92 d'*A. flavus* sur milieux CYA et extrait de blé après 21 jours d'incubation.

Tableau 35. Influence de l'activité de l'eau (a_w) et de la température sur la production de l'AFB1 ($\mu\text{g/g}$ de milieu) de la souche AF92 d'*A. flavus* sur milieux CYA et extrait de blé.

Milieu		CYA			Extrait de blé			
Temps d'incubation (jour)		7	15	21	7	15	21	
Activité de l'eau ($a_w = 0,85$)								
Température	20°C	0	0,20	0,32	0	0,25	0,34	
	25°C	2,30	5,82	5,69	0,21	0,65	0,89	
	30°C	7,32	10,41	12,51	0,50	0,78	1,66	
	37°C	0,40	0,43	2,04	0,14	0,20	0,30	
	Activité de l'eau ($a_w = 0,90$)							
	20°C	0,38	2,20	7,22	0	0,06	0,30	
	25°C	1,97	5,0	17,88	0	0,09	0,46	
	30°C	9,44	18,50	22,30	0,60	0,90	2,10	
	37°C	0	4,10	9,81	0,20	0,60	0,70	
	Activité de l'eau ($a_w = 0,95$)							
	20°C	0,48	12,30	13,04	0	0,14	0,20	
	25°C	17,14	23,40	34,56	1,25	1,30	2,50	
	30°C	16,18	42,52	45,60	1,10	2,44	6,80	
	37°C	2,60	4,04	15,11	0,40	0,45	0,55	
	Activité de l'eau ($a_w = 0,99$)							
	20°C	1,17	4,04	6,54	0	0,20	1,53	
25°C	20,38	35,68	46,28	0,72	4,10	9,20		
30°C	7,81	48,52	56,50	0,37	4,40	7,40		
37°C	6,72	12,57	23	0,12	0,66	2,80		

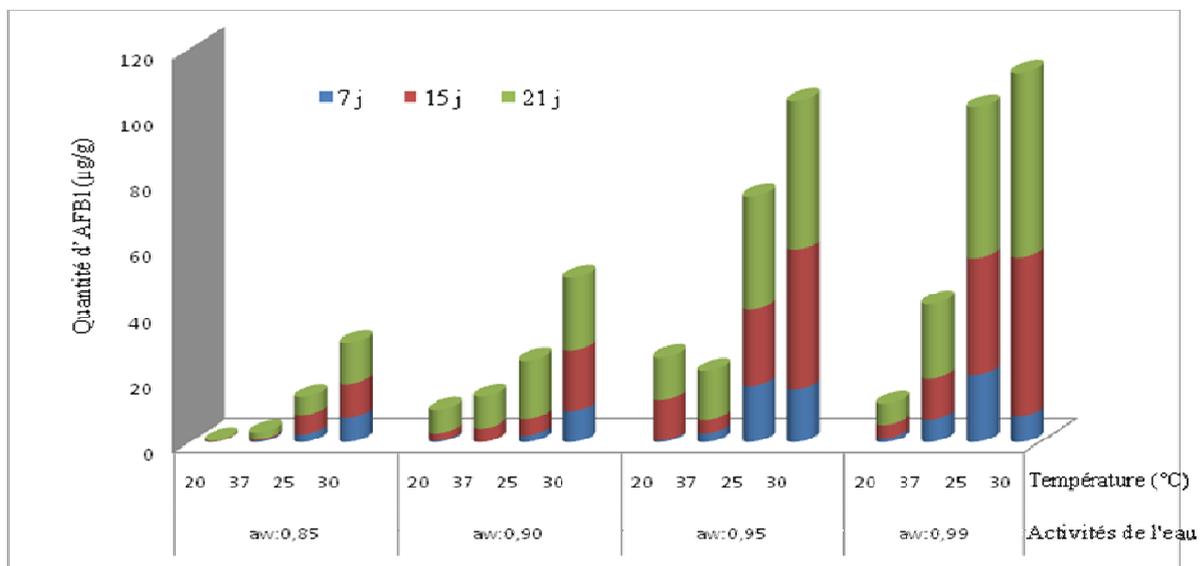


Figure 40. Influence de l'activité de l'eau et de la température sur la production de l'AFB1 par la souche AF92 d'*A. flavus* incubée à 28°C pendant 21 jours sur milieu CYA.

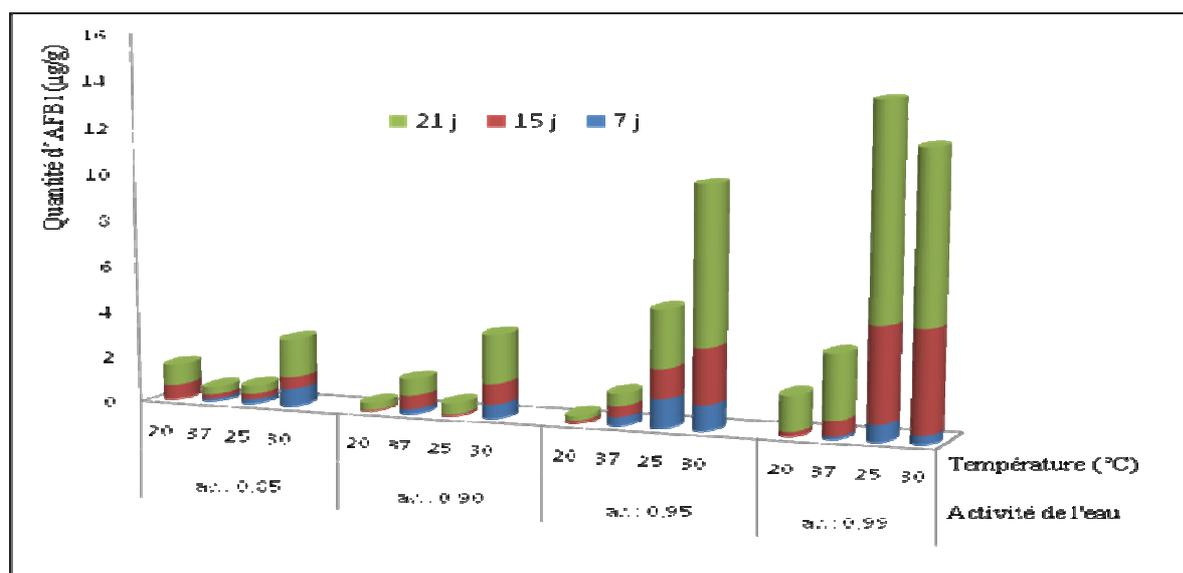


Figure 41. Influence de l'activité de l'eau et de la température sur la production de l'AFB1 par la souche AF92 d'*A. flavus*, incubée à 28°C sur milieu extrait de blé.

Selon Beuchat (1981), les valeurs minimales de l' a_w pour la croissance et la production des aflatoxines chez *A. flavus* sont respectivement de 0,78–0,80 et 0,83–0,87. Cette espèce se développe à une température comprise entre 10 et 43°C. Le rythme de développement optimal, pouvant atteindre 25 mm/j, est observé à une température légèrement supérieure à 30°C. *A. flavus* produit des aflatoxines lorsque la température est au moins comprise entre 15 et 37°C. L'effet du facteur d'humidité et de la température sur le comportement d'*A. parasiticus* est analogue à ce qui vient d'être décrit pour *A. flavus*. Pitt et Miscamble (1995) rapportent un minimum d'une a_w de 0,83 pour le développement de la moisissure et de 0,87 environ pour la production d'aflatoxine. Cependant, on ne dispose que de peu de données en ce qui concerne l'effet de la température sur le développement d'*A. parasiticus* et la production d'aflatoxines. Selon certaines sources (Horn et Dörner, 2002; Abbas *et al.*, 2005), les températures optimales pour le développement et la production d'aflatoxines seraient respectivement de 30 et 28°C.

Nos résultats, ayant montré une production optimale d'aflatoxine B1 à 30°C et à une a_w de 0,99 à partir du 15^{ème} jour sont en accord avec ceux rapportés par Kheiralla *et al.* (1992) et Gqaleni *et al.* (1997). Le milieu CYA, très favorable à la production des mycotoxines (Pitt et Hocking, 1997) est très utilisé pour étudier la mycotoxinogénèse. La production de mycotoxines est proportionnelle à la masse mycélienne. La faible production d'AFB1 sur milieu à l'extrait de blé par rapport au milieu CYA est en relation avec la très faible densité de mycélium produite sur ce milieu. De plus, la production des aflatoxines par *A. flavus* est favorisée par certains sucres: le glucose, le mannose, le fructose et le saccharose (Barrios-Gonzalez et Tomasini, 1996). D'après Klich (2007), pour *A. flavus* et *A. parasiticus*, les conditions optimales de croissance sont une température de 36°C et une a_w de 0,95 alors que la production d'aflatoxines est meilleure à une température de 33°C et une a_w de 0,99. Nos résultats ont révélé une croissance et une production optimale aux températures voisines de 30°C. Par contre à 37°C, la croissance et la production sont moins importantes. Cette différence dans la croissance peut s'expliquer par l'origine géographique des souches étudiées et par leurs différences physiologiques.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

L'objectif de ce travail est d'étudier les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A dans la filière blé. Pour cela, nous avons analysé 108 échantillons de blé et dérivés des récoltes de 2004 et 2006, collectés dans la Mitidja et les régions voisines (Blida, Alger, Boumerdès et Tizi Ouzou) et dans la région de Sétif. Les échantillons ont été prélevés aux stades de pré-récolte, de stockage dans les silos et au niveau d'une meunerie et d'une semoulerie. L'analyse de la flore fongique du blé et de ses dérivés a montré une densité de moisissures comprise entre 144 et 1277 cfu/g. On peut admettre, d'une manière générale, que le niveau de contamination par les moisissures n'est pas très élevé si l'on compare les résultats obtenus à la norme de 10^5 cfu/g fixée par la législation algérienne pour le blé et dérivés destinés à la consommation. Cependant, compte tenu de la diversité de la flore fongique, la densité n'a pas de signification en termes de l'évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans la chaîne alimentaire. Il serait donc plus judicieux d'évaluer les champignons toxinogènes présents dans les matières destinées à l'alimentation.

Parmi les champignons potentiellement toxinogènes (*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*), nous avons observé une dominance nette du genre *Aspergillus*. Ce résultat nous a conduit à l'étude du potentiel aflatoxinogène et ochratoxinogène des souches appartenant à ce genre fongique afin d'évaluer le risque de contamination de la filière blé en aflatoxines et en ochratoxine A. Les résultats de l'analyse fongique ont montré qu'*A. flavus* et *A. niger* sont les espèces les plus dominantes parmi une dizaine d'espèces isolées. Les données de la littérature mentionnent également la dominance du genre *Aspergillus* notamment *A. flavus* et *A. niger* dans les céréales et les produits céréaliers des régions où le climat est caractérisé par de longues périodes chaudes et sèches. Les caractères écophysiologiques font de ces deux espèces des contaminants très fréquents d'une grande variété de matières d'origine végétale (Pfohl-Leskowicz et Castegnaro, 2002; Accensi *et al.*, 2004). Nos résultats confirment par ailleurs la faible fréquence d'*A. alliaceus* et d'*A. ochraceus* et rapporte pour la première fois la contamination du blé par *A. carbonarius*. Cette espèce n'a jamais été mentionnée comme contaminant des céréales. Dans le genre *Penicillium*, *P. verrucosum* est la seule espèce ochratoxinogène pouvant contaminer les céréales, c'est pourquoi nous n'avons pas recherché les autres espèces appartenant à ce genre fongique.

La comparaison des échantillons collectés en 2004 et 2006 n'a pas montré une grande différence dans la composition de la flore fongique. Toutefois, la fréquence du genre *Aspergillus* est plus élevée dans les échantillons de 2004. Les espèces *A. flavus* et *A. niger* demeurent

toujours dominantes alors qu'*A. versicolor* a été isolée exceptionnellement à de fortes proportions dans les échantillons de 2004.

Par ailleurs, nous avons pu observer au cours de notre étude que le stockage dans les silos peut influencer considérablement la composition de la flore fongique des grains de blé. En effet, dans le blé stocké durant 6 et 12 mois, un taux élevé de certaines espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium* au dépend des *Fusarium* et *Alternaria* a été observé. Ceci confirme le statut de flore de stockage des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Le stockage a également révélé une fréquence plus élevée en *A. flavus*, et à un degré moindre *A. ochraceus*, dans certains échantillons, alors qu'*A. niger* était plus fréquent dans le blé non stocké. Ces observations sont importantes car elles mettent en évidence une incidence plus marquée des espèces potentiellement productrices d'aflatoxines et d'ochratoxine A dans le blé stocké.

La qualité du grain après récolte est influencé par une large variété de facteurs biotiques (microflore, insectes, acariens et rongeurs) et abiotiques (températures, humidité, activité de l'eau, etc.). Le grain stocké est lui-même considéré comme un écosystème particulier (Magan et Aldred, 2005). La biodisponibilité de l'eau (a_w) et la température représentent les deux paramètres les plus déterminants de l'évolution de la flore de grains réputés secs comme le blé. Cependant, le problème de la conservation se pose en termes très différents selon le niveau technologique du pays. Si dans la plupart des pays développés, les silos sont soumis à une forte surveillance, ce n'est pas le cas dans les pays en voie de développement où un manque de surveillance est remarqué. Les risques liés à la contamination par les champignons toxigènes sera donc plus élevé d'autant plus que dans ces pays le climat est plus propice à la prolifération des moisissures et d'autres organismes vivants tels que les insectes susceptibles de favoriser la production des mycotoxines.

La mise en évidence du pouvoir producteur d'aflatoxines par détection de la fluorescence sur milieux de culture à base d'extrait de noix de coco, a permis de montrer que cette technique, qui présente l'avantage d'être simple et moins coûteuse, est presque aussi performante que la détection par CCM. En outre, grâce à sa plus grande sensibilité, l'HPLC, munie d'une cellule de dérivation au brome, a permis de détecter même les isolats très faiblement producteurs d'aflatoxine B1 (AFB1). Ainsi, on peut préconiser l'utilisation du milieu à l'extrait de noix de coco comme méthode de criblage, c'est-à-dire comme méthode rapide de détection des isolats producteurs d'aflatoxines tout en tenant compte du seuil de détection. Cependant, la CCM et l'HPLC peuvent être utilisées pour la quantification et la confirmation des résultats obtenus sur milieu à base d'extrait de noix de coco.

Dans cette étude, nous n'avons pas révélé la présence d'aflatoxine de type G produite habituellement par *A. parasiticus* et *A. nomius* et par quelques souches de types « S » d'*A. flavus*. Ce dernier n'a été rencontré qu'une seule fois et produit uniquement l'AFB1 et l'AFB2.

L'ensemble des résultats relatifs à l'étude des caractères morphologiques et chimiotypiques des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* indique que cette section est dominée par l'espèce *A. flavus*. Les résultats de l'analyse moléculaire ont confirmé l'hypothèse selon laquelle les isolats aflatoxinogènes isolés des échantillons de blé et dérivés ont une même origine et que l'espèce *A. flavus* est la principale source d'aflatoxines.

A la lumière de ces résultats, nous pouvons dire qu'*A. flavus* constitue la principale source d'aflatoxines dans les échantillons de blé analysés.

La contamination par les isolats aflatoxinogènes des échantillons de blé analysés s'est aussi accompagnée de la production d'aflatoxine B1. En effet, 56,6% des échantillons étaient contaminés dont 16,7% présentaient un niveau de contamination supérieur à la norme européenne qui est de 5 µg/kg et 6,7% supérieur à la norme algérienne qui est 10 µg/kg. Même si la plupart des quantités détectées soient inférieures aux normes, ceci ne doit pas être considéré comme sans risque. En effet, les teneurs en AFB1 dans le blé peuvent être revues à la hausse si les conditions de la toxigenèse sont favorables (Miller, 2002; Wilson *et al.*, 2002). Nous avons pu constater, lors de l'étude de l'influence de la température et de l'activité de l'eau sur milieu CYA et sur milieu à base d'extrait de blé, que la croissance et la production d'AFB1 peuvent avoir lieu même dans les conditions les moins favorables. En effet, *A. flavus* est capable de produire l'AFB1 sur milieu extrait de blé même aux températures de 20 et 37°C et aux faibles activités de l'eau ($a_w = 0,85$).

Les facteurs conduisant à l'imprégnation mycotoxique d'une denrée sont liés non seulement à la souche fongique mais également à l'ensemble des conditions écologiques. Mais il est généralement admis que plus le taux initial de la contamination par des espèces toxigènes est important et plus les risques d'imprégnations toxiques sont élevés.

Les résultats relatifs à la production d'OTA ont montré que près de 35% des isolats appartenant au genre *Aspergillus* et *Penicillium* produisent cette mycotoxine. Les taux de production des isolats de 2004 et de 2006 sont de 40 et 30,43% respectivement. La forte production d'OTA par *A. alliaceus* et *A. ochraceus* signalée dans la littérature a été confirmée. D'autres espèces du genre *Aspergillus* et tout particulièrement *A. niger*, très dominant dans les échantillons non stockés et *P. verrucosum* peuvent aussi constituer une source de contamination

par l'OTA. La contamination du blé par les espèces ochratoxinogènes s'est traduite par la présence de l'OTA dans 19 échantillons sur les 53 analysés (36%), dont 5 (9,4%) dépassaient la norme de 5 µg/kg.

L'écologie complexe du développement des moisissures et de la production de mycotoxines peut aboutir à la présence de mélanges de mycotoxines dans la nourriture de l'homme et de l'animal, en particulier dans les céréales. La présence à la fois, dans les différents échantillons analysés, d'isolats capables de produire l'aflatoxine B1 et l'OTA signifie que le risque de retrouver ces deux mycotoxines dans le même échantillon est réel. En plus, la présence concomitante de mycotoxines peut influencer sur la quantité de mycotoxines produites (Miller, 1995). Ainsi, la production des aflatoxines dans les céréales pendant le stockage, par exemple, peut être accrue par la présence de trichothécènes (Schiefer *et al.*, 1986). Il est à noter que les données toxicologiques disponibles concernent principalement les toxines prises individuellement et non les effets résultant de l'association de mycotoxines, alors qu'elles peuvent être présentes simultanément sur la même denrée ou dans une même ration.

Les isolats fongiques aflatoxinogènes et ochratoxinogènes et leurs mycotoxines respectives ont été retrouvés dans le blé stocké, non stocké et dans le produit fini. Ces observations confortent l'idée selon laquelle la contamination peut avoir lieu au champ, au cours du stockage et après transformation des graines. Compte tenu du caractère hétérogène du développement très variable des moisissures toxinogènes dû aux différences génétiques, aux conditions écologiques et aux difficultés d'échantillonnage et de dosage, il est très difficile d'établir des corrélations entre les espèces toxinogènes et les niveaux de contamination des échantillons par les mycotoxines.

Sur le plan de la sécurité sanitaire des aliments, notre travail est une contribution à une analyse des risques liés à la contamination du blé par les aflatoxines et l'ochratoxine A en Algérie. Avant toute extrapolation de nos résultats, il faut noter que ceux-ci ne représentent pas une large gamme de situations. Ce travail est une étude préliminaire ouvrant la porte à de nombreux autres travaux sur la contamination des denrées alimentaires de large consommation aux aflatoxines et à l'OTA. Pour cela, il serait intéressant, en perspective, d'effectuer les travaux suivants:

- élargir la recherche de ces mycotoxines à une plus grande échelle en incluant le blé importé avec les différents maillons de la chaîne;
- étudier d'une manière approfondie l'écologie des champignons toxinogènes et l'influence des conditions de stockage (température, humidité, composition en gaz) sur la toxinogénèse;

- élargir les recherches sur d'autres types de denrées alimentaires de large consommation (autres céréales, légumes secs, épices, etc.) susceptibles d'être contaminés par les champignons aflatoxinogènes et ochratoxinogènes;

- appliquer de manière approfondie les techniques moléculaires dans l'optique de mieux connaître la diversité génétique des isolats toxigènes;

- étudier l'influence de la compétition ou de la synergie entre champignons, notamment du genre *Aspergillus*, sur la production des mycotoxines.

Au plan préventif, il convient d'émettre un certain nombre de recommandations pour réduire les risques liés à la présence de ces mycotoxines dans l'alimentation. Les conditions climatiques au moment de la récolte, les conditions de stockage des grains dans les silos et la contamination des équipements et des locaux de transformation peuvent constituer des points critiques favorisant le risque de contamination par les aflatoxines et l'ochratoxine A.

Selon Park (1993), un programme de surveillance de la contamination des aliments par des substances toxiques naturelles doit prendre en compte :

- l'établissement de limites réglementaires;
- l'établissement d'un plan d'échantillonnage;
- la lutte par l'utilisation de bonnes pratiques agricoles;
- la lutte pendant la transformation;
- la décontamination par des traitements spécifiques.

Les points critiques à surveiller dans la contamination en mycotoxines dans les céréales sont situés à différents maillons de la chaîne:

Au niveau du champ: La présence d'isolats aflatoxinogènes et ochratoxinogènes dans les échantillons de blé stockés et non stockés signifie que la production de ces mycotoxines peut avoir lieu aussi bien au champ que pendant le stockage, si les conditions sont favorables. Les mesures permettant de réduire les seuils de contamination au champ sont :

- Rotation des cultures et gestion des résidus: les résidus laissés dans le champ après la récolte peuvent constituer un lieu de survie et de développement fongique l'année suivante. L'élimination de ces débris peut réduire sensiblement le taux d'inoculum. Il est aussi important de respecter les pratiques culturales telles que les dates des semis. En effet une plantation tardive peut provoquer un retard de maturité des grains qui ne seront pas assez secs avant la récolte.

- Attaque des insectes: les grains endommagés par les insectes facilitent l'infestation par des champignons comme *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*. Les teneurs en eau peuvent atteindre alors des conditions favorables à la production d'aflatoxines (Hesseltine et al, 1981).

Les insectes, endommagent l'enveloppe des grains, ce qui favorise la pénétration de l'inoculum à l'intérieur de la graine.

- Utilisation d'antifongiques: le traitement des semences par les antifongiques peut être un moyen de lutte efficace pour réduire le niveau de contamination en moisissures.

- Les conditions de récolte sont importantes pour réduire le développement de moisissures, notamment lors du stockage ultérieur des céréales. Il faut veiller à récolter le grain suffisamment mur, car la disponibilité en eau dans les grains est très propice au développement fongique (Molinié et Pfohl-Leszkowicz, 2003). Il est aussi important de minimiser les dommages mécaniques des grains favorables au développement des champignons en cours de stockage et à l'attaque des insectes.

- Pendant le stockage: après la moisson ou au cours de leur circuit commercial, les céréales subissent des phases de stockage. Le stockage du blé en Algérie est réalisé principalement par les coopératives de céréales et des légumes secs (CCLS) et une partie est acheminée par les agriculteurs eux même aux unités de transformations (meunerie et semoulerie). Les structures de stockage rencontrées le plus couramment sont des cellules (unité de stockage) métalliques, ou des structures en béton à fond plat, ne possédant que peu ou pas de contrôle de thermométrie et de système de ventilation. Des bonnes pratiques de conservation consistent à éviter son altération en contrôlant trois principaux facteurs: la température, la teneur en eau du grain (a_w) et la durée du stockage. Ces facteurs influencent le développement de la flore (microorganismes et insectes) présente sur le grain.

Il est préconisé de respecter certaines normes telles que:

- la teneur en eau, qui doit être inférieure à 14%;
- l'élimination de diverses impuretés (grains étrangers, grains avariés)
- le contrôle régulier de la température tout en évitant les élévations trop importantes en utilisant des systèmes de ventilations.

Il faut rappeler que les moisissures se développent en particulier lorsque la ventilation du grain est mal adaptée ou inexistante. La température et l'humidité élevées sont les conditions requises pour leur développement. L'idéal serait de stocker un grain à 12-13% d'humidité. Si le grain est très humide, une phase spécifique de séchage doit être réalisée pour limiter les risques. Sans ventilation des lots de grains, des poches d'humidité fournissent localement les conditions favorables de développement. Lorsque certaines structures ne permettent pas une ventilation, les lots peuvent alors être « transilés » (rotation des lots d'une cellule à une autre) plusieurs fois pendant leur stockage pour aérer les grains.

S'il existe des moyens de lutte contre les ravageurs des cultures et les contaminations fongiques au niveau du champ, la production de toxines, surtout au niveau du stockage, reste difficilement contrôlable. Il n'existe pas de moyens de lutte utilisant des antifongiques contre le développement des moisissures de stockage. Par contre la population d'insectes contaminant les céréales peut être diminuée en utilisant des insecticides de contact (généralement le grain est traité par fumigation).

Un manuel ayant pour but de conseiller les pays ou les institutions à l'application du système HACCP pour la prévention et le contrôle des mycotoxines, a été élaboré par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (F.A.O) et l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA) (FAO/AIEA, 2002).

L'application de bonnes pratiques agricoles et d'hygiène au stade de la production, de la transformation et de la distribution des denrées alimentaires, améliore la sécurité sanitaire des aliments tout en réduisant les pertes de produits, contribuant ainsi à accroître les approvisionnements et la sécurité alimentaire au niveau national et international. Les pays qui sont en mesure d'assurer la sécurité sanitaire des denrées alimentaires peuvent exploiter de nouveaux débouchés commerciaux sur le marché international, améliorant ainsi les niveaux de revenu et la sécurité alimentaire des ménages.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A.F.S.S.A (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) (2006).- Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique, 181p.
- A.O.A.C (1995).- Association of Official Analytical Chemists. Official Methods 973.37 et 975.38 (16th ed., pp. 31–32). Arlington, Virginia, USA.
- A.O.A.C (2000).- Association of Official Analytical Chemists. 17th end, 2000 Chapter 49, subchapter 1 Mycotoxins/subchapter 2 Aflatoxins.
- Abarca M.L., Accensi F., Bragulat M.R., Castella G. et Cabanes F. J. (2003).- *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *Journal of Food Protection*, **66**, 504–506.
- Abarca M.L., Accensi F., Cano, J. et Cabanes F.J. (2004).- Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, **86**, 33–49.
- Abarca M.L., Bragulat M.R., Castella G. et Cabanes F.J. (1994).- Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, **60** (7), 2650-2652.
- Abarca M.L., Bragulat M.R., Castella G., Accensi F. et Cabañes F.J. (1997).- New ochratoxigenic species in the genus *Aspergillus*. *Journal of Food Protection*, **60**, 1580-1582.
- Abbas H.K., Zablutowicz R.M., Bruns H.A et Abel C.A. (2006).- Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Biocontrol Science and Technology*, **16**(5), 437–449.
- Abbas H.K., Weaver M.A., Zablutowicz R.M., Horn B.W. et Shier W.T. (2005).- Relationships between aflatoxin production and sclerotia formation among isolates of *Aspergillus* section *Flavi* from the Mississippi Delta. *European Journal of Plant Pathology*, **112**, 283–287.
- Abdel Hafez S.I., Moubasher A.H., Shoreit A.A. et Ismail M.A. (1990).- Fungal flora associated with combine harvester wheat and sorghum dusts from Egypt. *Journal of Basic Microbiology*, **30**, 467–479.
- Abdulkadar A.H.W., Abdulla A. Al-Ali., Afrah M. Al-Kildi et Jassim H. Al-Jedah (2004).- Mycotoxins in food products available in Qatar. *Food Control*, **15**, 543–548.
- Accensi F., Abarca M.L. et Cabanes F.J. (2004).- Occurrence of *Aspergillus* species in mixed feeds and component raw materials and their ability to produce OTA. *Food Microbiology*, **21**, 623–627.

- Alberts J.F., Engelbrecht Y., Steyn P.S, Holzapfel W.H et van Zyl, W.H. (2006).- Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *International Journal of Food Microbiology*, **109**, 121–126.
- Alexopoulos C.J., Mims C.W. et Blackwell M. (1996).- *Introductory Mycology*. 4th ed. New York, John Wiley and Sons, Inc.
- Alldrick A. J. (1996).- The effects of processing on the occurrence of ochratoxin A in cereals. *Food Additives and Contaminants*, **13**, 27–28.
- Al-Musallam A. (1980).- Revision of the black *Aspergillus* species. Ph.D. Thesis. University of Utrecht, Netherlands.
- Anonyme (2008).- La production céréalière en chute libre. El Watan n° 5402 du 11 août 2008.
- Araguas C., Gonzalez-Penas E. et Lopez de CeraIn: A. (2005).- Study on Ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. *Food Chemistry*, **92**, 459–464.
- Arrus K., Blank G., Abramson D., Clear R. et Holley R.A. (2005).- Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *Journal of Stored Products Research*, **41**, 513–527
- Atalla M.M. et El-Din K.N. (1993).- Production of ochratoxin A in a semi synthetic medium. *Egyptian Journal of Microbiology*, **28**, 271–279.
- Atalla MM, Hassanein NM, El-Beih A.A et Yussef Y.A. (1999).- Fungi associated with wheat grains with special reference to mycotoxin producing isolates. *African Journal of Mycology and Biotechnology*, **7**, 35–48
- Bacon C.W., Yates I., Hinton D.M. et Meredith F. (2001).- Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environmental Health Perspectives*, **109** (S2), 325–327.
- Bammler T.K, Slone D.H. et Eton D.L. (2000).- Effects of dietary oltipraz and ethoxyquin on aflatoxins B1 biotransformation in non-human primates. *Toxicology Science*, **54**, 30–41.
- Barrios-Gonzalez J. et Tomasini A. (1996).- Production of aflatoxins in solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **55**, 424–430.
- Barros G., Torres A. et Sofia Chulze S. (2005).- *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region. Sclerotia production and toxigenic profile. *Journal of Science Food and Agriculture*, **85**, 2349–2353.
- Battilani P., Giorni P. et Pietri A. (2003).- Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology*, **109**, 715–722.
- Baydar T., Engin A.B., Girgin G., Aydin S. et Sahim G. (2005).- Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey. *Annals of Agricultural and Environmental Medical*, **12**, 193–197.
- Bayman P. et Baker J.L. (2006).- Ochratoxins, a global perspective. *Mycopathologia*, **162**, 215–223.

- Bayman P. et Cotty P.J. (1991).- Vegetative compatibility and genetic diversity in the *Aspergillus flavus* population of a single field. *Canadian Journal of Botanic*, **69**(8), 1707–1711.
- Bayman P., Baker, J.L., Doster M.A., Michailides T.J. et Mahoney, N.E. (2002).- Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 2326–2329.
- Belli N., Pardo E., Marin S., Farre G., Ramos A.J., et Sanchis V. (2004).- Occurrence of Ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*, **84**, 541–546.
- Bennett J.W. et Klich M. (2003).- Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review*, **16**, 497–516.
- Bennett J.W. et Papa K.E. (1988).- The aflatoxigenic *Aspergillus* spp. In: Ingram, D. S., Williams, P. A., eds. Genetics of Plant Pathogenic Fungi. London, Academic Press, pp. 263–280.
- Berghofer L.K., Hocking A.D., Miskelly D. et Jansson E. (2003).- Microbiology of wheat and flour milling in Australia. *International Journal of Food Microbiology*, **85**, 137–149.
- Beuchat L.R. (1981).- Microbial stability as affected by water activity. *Cereal Foods World*, **26**, 345–349.
- Bhatnagar D., Yu J. et Ehrlich K. C. (2002).- Toxins of filamentous fungi. *Chemistry and Immunology*, **81**, 167–206.
- Blesa J., Soriano J.M., Molto, J.C. et Manes, J. (2004).- Concentration of ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of valencian Community (Spain). *Journal of Chromatography* 1- 2, **1054**, 397– 401.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M. et Davis R.W. (1980).- Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, **32**(3), 314–331.
- Botton B. (1990).- Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, 2ème ed. Masson ed, Paris. 1990.
- Bouchet P., Guignard J.L., Madulo–Leblond G. et Régli P. (1989).- Mycologie générale et médicale. Ed.Masson (Paris), Chap.4 ,36.
- Boutrif E. et Canet C. (1998).- Mycotoxin prevention and control, FAO programmes. *Revue de médecine vétérinaire*, **149**, 681–694.
- Bragulat M.R., Abarca M.L. et Cabanes F.J. (2001).- An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology*, **71**, 139– 144.

- Bullerman L.B., Ryu D. et Jackson L.S. (2002).- Stability of fumonisins in food processing. *Advances Experimental and Medical Biology*, **504**, 195–204.
- Buser M.D. et Abbas H.K. (2002).- Effects of extrusion temperature and dwell time on aflatoxin levels in cottonseed. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, **50**, 2556–2559.
- C.A.S.T (Council for Agricultural Science. and Technology) (2003). - Mycotoxins, Risks in Plant, Animal, and Human Systems. *Task force report*. **139**, ISBN N° 1–887383–22–0, pp 200, Ames IOWA, USA.
- C.A.S.T(Council for Agricultural Science. and Technology) (1989).- Mycotoxins, economics and health risks. *Task force report*. N° 116. Ames, Iowa, USA.
- C.D.C (Centers for Disease Control and Prevention) (2004).- Outbreak of aflatoxin poisoning– Eastern and Central Provinces, Kenya. *MMWR* **53**, 790–793. Available from, <http://www.cdc.gov/nceh/hsb/chemicals/mmwr-aflatoxin.pdf>.
- C.I.R.C (1993).- Centre International de Recherche contre le Cancer. Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, in IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans, No. 56, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1993, pp. 245–395.
- C.I.R.C (2002).- Centre International de Recherche contre le Cancer. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, World Health Organization. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. Summary of Data Reported and Evaluation, vol. 82. Lyon, pp. 171–175.
- Cahagnier B., Dragacci S., Frayssinet C., Fremy J.M., Hennebert G.L., Lesage–Meessen L., Multon J. F., Richard–Molard D. et Roquebert M.F. (1998).- Moisissures des aliments peu hydratés. Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris, France. 218p.
- Calvo A.M., Bok J., Brooks W. et Keller N.P. (2004).- *veA* is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 4733–4739.
- Campbell-Platt G. et Cook P.E. (1989). Fungi in the production of foods and food ingredients. *Journal of Applied Bacteriology*, **67**, 117S–131S.
- Canadas D. (2006).- Evaluation du procédé Oxygreen® pour son potentiel de décontamination en ochratoxine A du blé. Les effets toxiques liés à une exposition sub–chronique à l’ochratoxine A sont–ils atténués? Thèse de Doctorat, 232p. INP/ENSAToulouse. France
- Cardwell K.F. et Cotty P.J. (2002).- Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* among field soils from the four agroecological zones of the Republic of Benin West Africa. *Plant Diseases*, **86**, 434–439.

- Carnegie A.J., Ades P.K. et Ford R. (2001).- The use of RAPD–PCR analysis for the differentiation of *Mycosphaerella* species from Eucalyptus in Australia. *Mycological Research*, **105**, 1313–1320.
- Castegnaro M., Barek J., Fremy J.–M., Lafontaine M. Miraglia M., Sansone E.B. et Telling, G.M.(1991).- Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes, Some mycotoxins, IARC Scientific Publications No. 113. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Castegnaro M., Canadas D., Vrabcheva T., Petkova–Bocharova T., Chernozemsky I. N. et Pfohl Leszkowicz A. (2006).- Balkan endemic nephropathy, Role of ochratoxin A through biomarkers. *Molecular Nutrition and Food Research*, **50**, 519–529.
- Chang P.K, Ehrlich K.C. et Hua S.S.T (2006).- Cladal relatedness among *Aspergillus oryzae* isolates and *Aspergillus flavus* S and L morphotype isolates. *International Journal of Food Microbiology*, **108**, 172–177.
- Chelkowski J., Golinski P. et Szebioto K. (1981).- Mycotoxins in cereal grain . Part II. The fate of ochratoxine A after processing of wheat and barley grain . *Nahrung*, **25**, 423–426.
- Chiavaro E., Dall’Asta, C., Galaverna G., Biancardi A., Gambarelli E., Dossena A. et Marchelli R. J. (2001).- New reversed–phase liquid chromatographic method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. *Journal of Chromatography*, **A7**, 31–40.
- Christensen C.M., Mirocha, C.J. et Meronuck, R.A. (1977).- Molds Mycotoxins and Mycotoxicoses. Agricultural Experiment Station Miscellaneous Report 142. University of Minnesota, St. Paul, MN.
- Christensen M.A. (1981).- Synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia*, **73**, 1056–1084.
- Ciegler A., Lillehoj E.B., Peterson R.E. et Hall H.H. (1996).- Microbial detoxification of aflatoxin. *Applied Microbiology*, **14**, 934–939.
- Cole RJ et Cox RH. (1981).- Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press, New York.
- Commission Regulation (E.C.) (2002).- Commission Regulation N° 472/2002 of 12 march 2002. *Official Journal of European Communities*, **L75**(18), 16/03/2002.
- Cotty P. J. (1989).- Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology*. **79**, 808–814.
- Cotty P. J. et Cardwell K. F. (1999).- Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 2264–2266.

- Cotty P.J. (1997).- Spatial and temporal patterns of *Aspergillus flavus* strain composition and propagule density in Yuma County, Arizona soils. *Plant Diseases*, **81**, 911–916.
- Creppy E. E. (2002).- Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology letters*, **127**, 19–28.
- Criseo G., Bagnara A. et Bisignano G. (2001).- Differentiation of aflatoxin-producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* group. *Letters in Applied Microbiology*, **33**, 291–295
- Czerwiecki L., Czajkowska D. et Witkowska-Gwiazdziwska A. (2002).- On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and ecological farms. Part 1, The occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1997. *Food Additive and Contaminants*, **19**, 470–477.
- Da Rocha Rosa C.A., Palacios V., Combina M., Fraga M.E., De Oliveira Rekson A., Magnoli, C.E., et Dalcero A.M. (2002).- Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additive and Contaminants*, **19**, 408–414.
- Davis N. D., Iyer S. K. et Diener U. L. (1987).- Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied and Environmental Microbiology*. **53**, 1593–1595.
- Demain A.L., Fang A. (2000).- The natural functions of secondary metabolites. *Advances of Biochemistry Engineering and Biotechnology*, **69**, 1–39.
- Doré T., Le Bail M., et Verger P. (2002).- Pratiques agricoles et sécurité sanitaire des aliments en production végétale. *Cahiers Agricultures*, **11**(13), 177–185.
- Dorner J.W., Cole R.J. et Diener U.L. (1984).- The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. *Mycopathologia*, **87**, 13–15.
- Dorner J.W., Cole R.J., Lomax, L.G., Gosser H.S. et Diener U.L. (1983).- Cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* and its effects on broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, **46**, 698–703.
- Doyle M.P., Appelbaum R.S., Brackett R.E. et Marth E.H. (1982).- Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities. *Journal of Food Protection*, **45**, 964–971.
- Dutton, M. F., Ehrlich, K., and Bennett, J. W. 1985. Biosynthetic relationship among aflatoxins B1, B2, M1 and M2. *Applied and Environmental Microbiology*, **49**, 1392–1398.
- Edel V. (1998).- Polymerase chain reaction in mycology, an overview. In: Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A., Elander, R.P. Applications of PCR in mycology. CAB International. UK.
- Ehrlich K.C. Kobbeman K., Montalbano B.G. et Cotty P.J. (2007).- Aflatoxin producing *Aspergillus* species from Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, **114**, 153–159.

- El Adlouni C., Tozlovanu M., Natman F., Faid M. et Pfohl–Leszkowicz A. (2006).- Preliminary data on the presence of mycotoxins (OTA, citrinin and aflatoxin B1) in black table olives “greek style” of Moroccan origin . *Molecular Nutrition and Food Research*, **50**, 507–512.
- El Kady I., El–Maraghy S. et Zohri A.N. (1994).- Mycotoxin producing potential of some isolates of *Aspergillus flavus* and *Eurotium* groups from meat products. *Microbiological Research*, **149**, 297–307.
- El Modafar D., Tantaoui A., El Boustani E. (2000).- Changes in cell wall bound phenolic compounds and lignin in roots of date palm cultivars differing in susceptibility to *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*. *Journal of Phytopathology*, **148**, 405–411.
- European Union (2002).- "Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states". SCOOP Task 3.2.7. Directorate–General Health and Consumer Protection.
- FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2004).- Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition paper 81. FAO, Rome.
- FAO/IAEA. (2002).- Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and Control. FAO Food and Nutrition Paper 73, Rome, Food and Agriculture Organization/International Atomic Energy Agency.
- Faucet–Marquis V. (2005).- L'ochratoxine A, contaminant alimentaire, est–elle un cancérigène génotoxique ou épigénétique ? Recherche des effets génotoxiques par la technique de post–marquage de l'ADN au 32P en relation avec la métabolisation de l'ochratoxine A, mémoire de thèse, INP, Toulouse. 285p.
- [Felsenstein J.](#) (1981).- Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, **17**(6):368–376.
- Fente C. A., Ordaz J. J., Vazquez B. I., Franco C. M. et Cepeda A. (2001).- New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin–producing *Aspergillus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(48), 58–62.
- Fernandez Pinto V., Patriarca A., Locani O., Vaamonde G. (2001).- Natural co–occurrence of aflatoxin and cyclopiazonic acid in peanuts grown in Argentina. *Food Additive and Contaminants*, **18**, 1017–1020.
- Filali A., Betbeder A.M., Baudrimont I., Benayada A., Soulaymani R. et Creppy, E.E. (2002).- OTA in human plasma in Morocco, a preliminary survey. *Human and Experimental Toxicology*, **21**, 241–245.
- Florent J. (1993).- Moisissure. In microbiologie industrielle. Les micro–organismes d'intérêt industriel. Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris. pp113–115.

- Franco C. M., Fente C. A., Vazquez B. I., Cepeda A., Mahuzier G. et Prognon P. (1998).- Interaction between cyclodextrins and aflatoxins Q1, M1 and P1, fluorescence and chromatographic studies. *Journal of Chromatography*, **A 815**, 21–29.
- Frisvad J.C. et Samson R.A. (1991).- Mycotoxins produced in species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. In: Chelkowski, J.(Ed.) Cereal Grain Mycotoxins, Fungi and quality in Drying and storage.; pp 441–476. Elsevier, Amsterdam.
- Frisvad J.C. et Samson R.A. (2004).- *Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing stérigmatocystine and aflatoxin B1., System. *Applied Microbiology*, **27**, 672–680.
- Frisvad J.C. et Samson R.A. (2000).- *Neopetromyces* gen nov and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subg. *Circumdati*. *Studies Mycology*, **45**, 201–207.
- Frisvad J.C., Skouboe P, Samson R.A. (2004).- A new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3–O–methylsterigmatocystIn: *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, **28**, 442–453.
- Frisvad J.C., Skouboe P. et Samson R.A. (2005).- Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3 OmethylsterigmatocystIn: *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, **28**, 442–453.
- Galvano F., Galofaro V., Ritieni A., Bognanno M., De Angelis A. et Galvano G. (2001).- Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy, second year of observation. *Food Additive and Contaminants*, **18**(7), 644–646.
- Gams W., Christensen M., Onions A.H. S., Pitt J.I. et Samson R.A. (1985).- Infrageneric taxonomy of *Aspergillus*. In: Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics, R. A. Samson, Pitt, J.I. (eds), Plenum Press, New York, pp. 55–61.
- Gao J., Liu Z. et Yu J., (2007). Identification of *Aspergillus* section *Flavi* in maize in northeastern China. *Mycopathologia*, **11**, 91–95
- Geiser D.M., Dorner J.W., Horn B.W. et Taylor J.W. (2000).- The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, **31**, 169–179.
- Geiser D.M., Frisvad J.C. et Taylor J.W. (1998).- Evolutionary relationships in *Aspergillus* section *Fumigati* inferred from partial beta–tubulin and hydrophobin DNA sequences. *Mycologia*, **90**, 831– 845.
- Ghiasian S.A., Kord–Bacheh P., Rezayat S.M., Maghsood A.H. et Taherkhani H. (2004).- Mycoflora of Iranian maize harvested in the main production areas in 2000. *Mycopathologia*, **158**, 113–121.

- Giorni P., Magan N., Pietri A., Bertuzzi T., Battilani P. (2007).- Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, **113**, 330–338.
- Gourama H. et Bullerman L.B. (1995).- *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, aflatoxigenic fungi of concern in foods and feed – a review. *Journal of Food Protection*, **58**, 1395–1404.
- Gqaleni N., Smith J.E., Lacey J. et ettinby G. (1997).- Effects of temperature and water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus fl avus* in surface agar culture. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 1048–1053.
- Guarro J., Gené J. et Stchigel A.M. (1999).- Developments in fungal taxonomy. *Clinical and Microbiological Review*, **12** (3), 454–500.
- Hadrys H., Balick M. et Schierwater B.(1992).- Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in Molecular ecology. *Molecular Ecology*, **1**(1), 55–63.
- Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. et Pegler D.N. (1995).- Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 8th ed. Cambridge, CAB International Mycological Institute, Egham, United Kingdom.
- Henry S.H. et Bosch F.X. (2001).- Foodborne disease and mycotoxin epidemiology, in Foodborne Disease Handbook, 2nd ed., Hui, Y.H., Smith, R.A., et Spoerke, Jr., D.G., Eds., Marcel Dekker, New York.
- Henry T., Iwen P.C. et Hinriche H. (2000).- Identification of *Aspergillus* species using ITS regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*, **38** (4), 1510–1515.
- Hesseltine C. W., Shotwell O. L., Smith M., Ellis J. J., Vandegraft E. et Shannon G. (1970).- Production of various aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* series. Pages 202–210 In: Toxic Micro–organisms. M. Herzberg, ed. U. S. Gov. Print. Office, Washington, D.C.
- Hesseltine C.W. et Graves R.R. (1966).- Microbiology of flours. *Economic Botany*, **20**, 156–168.
- Hesseltine C.W., Rogers R.F. et Shotwell O. (1981).- Aflatoxin and mould flora in North Carolina crop. *Mycologia*, **73**, 216–278.
- Hocking A.D. et Pitt J.I. (2003).- Mycotoxigenic fungi, In: Hocking, A.D. (Ed.), Foodborne microorganisms of public health significance, 6th Ed. Australian Institute, Sydney.
- Hormisch D., Brost I., Kohring G.–W., Giffhorn F., Krippenstedt R.M., Stackebrandt E., Farber P., et Holtzapfel, W.H. (2004).- *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov., a fluoranthene and aflatoxin B1 degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant. *Systematic and Applied Microbiology*, **27**, 553–660.

- Horn B. W. et Dorner J. W. (1999).- Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 1444–1449.
- Horn B.W. et Dorner J.W. (1998).- Soil populations of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanutgrowing regions of the United States. *Mycologia*, **90**, 767–776.
- Horn B.W. et Dorner J.W. (2002).- Effect of competition and adverse culture conditions on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* through successive generations. *Mycologia*, **94**, 741–751.
- Horn B.W., Greene R.L., Sobolev V.S., Dorner J.W. Powell J.H. et Layton R. C. (1996).- Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii*. *Mycologia*, **88**(4),574–587.
- Horn BW. (2003). Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. *Journal of Toxicology. – Toxin Reviews*, **22**, 351–379.
- Hsieh D.P.H., Atkinson D.N. et Zhao M.S. (1992).- Aflatoxin–DNA adducts and P53 gene alterations in human liver. Abstracts. VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxms, Mexico City, p.36.
- Hsu M.C., Chen K.W., Lo H.J., Chen Y.C., Liao M.H., Lin Y.H., et Li S.Y. (2003).- Species identification of medically important fungi by use of real–time Light Cycler PCR. *Journal of Medical Microbiology*, **52**, 1071–1076.
- <http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7.pdf>.
- Hua Sui Sheng T. (2002).- Biocontrol of *Aspergillus flavus* by Saprophytic Yeast, Progress from Laboratory Bioassay to Field Trial. Proceedings of the 3rd Fungal Genomics, 4th Fumonisin: and 16th Aflatoxin Elimination Workshops. October 13–15, 2003 Savannah, Georgia USA.
- Huff W.E., Kubena L.F., Harvey R.B., Phillips T.D. (1992).- Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. *Poultry Science*, **71**, 4–69.
- Hussein H.S. et Brasel J.M. (2001).- Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, **167** (2), 101–134.
- Huwig A., Freimund S., Kappelli O. et Dutler H. (2001).- Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology letters*, **122**, 179–188.
- Hwang J.H et Lee K.G. (2006).- Reduction of aflatoxin B1 contamination in wheat by various cooking treatments. *Food chemistry*, **98**,71–75.
- I.S.O (International Organization for Standardization) (1987).- Microbiology-General guidance for enumeration of yeast and moulds-Colony count technique at 25°C International Standard 11–2.ISO 7954.

- Iavicoli I., Brera, C., Carelli G., Caputi R., Marinaccio A., et Miraglia M. (2002).- External and internal dose in subjects occupationally exposed to ochratoxin A. *International Archives Occupational Environmental Health*, **75**, 381–386.
- Ito Y., Peterson S.W., Wicklow D.T. et Goto T. (2001).- *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research*, **105**, 233–239.
- Jarvis B.B. et Miller J.D. (2005).- Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **66**, 67–372.
- Jimenez M., Mateo R., Querol A., Huerta T., Hernandez E. (1991).- Mycotoxins and mycotoxigenic moulds in nuts and sunflower seeds for human consumption. *Mycopathologia*, **115**, 121–127.
- Jorgensen K. (1998).- Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, **15**, 550–554.
- Journal officiel de l'Union européenne (2006).- Fixation des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. Règlement (CE) No 1881/2006, 19 décembre 2006 n° L 364/13.
- Kamiya A., Kikuchi A., Tomita Y. et Kanbe T. (2004).- PCR and PCR–RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. *Journal of Dermatological Science*, **34**(1), 35–48.
- Khalef A., Zidane C., Charef A., Gharbi A., Tadjerouna M., Betbeder A.M., Creppy E.E. (1993).- Ochratoxicose humaine en Algérie. In: Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G, editors. Human ochratoxicosis and its pathologies. Montrouge, France, INSERM/John Libbey Eurotext. pp 123–127.
- Kheiralla Z.H., Hassanin N. I. et Amra H. (1992).- Effect of incubation time, temperature and substrate on growth and aflatoxin production. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **30**, 17–27.
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**:111–120.
- King A.D., Hocking A.D. et Pitt, J.I. (1979).- Dichloran–rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Applied and Environmental Microbiology*, **37**, 959–964.
- Kitova A.E., Kuvichkina T.N., Arinbasarova A.Y. et Reshetilov A.N. (2004).- Degradation of 2,4–dinitrophenol by free and immobilized cells of *Rhodococcus erythropolis* HL PM–1. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **40**, 258–261.

- Klich M., Mullaney E.J., Daly C.B. et Cary J.W. (2000).- Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamaritii* and *A. ochraceoroseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **53**, 605–609.
- Klich M.A. (2002).- Identification of Common *Aspergillus* Species. Utrecht, Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Klich M.A. (2007).- Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*, **48**, 71–80.
- KOBRA Cell (2005).- Cellule électrochimique pour la dérivation des aflatoxines par HPLC. R–Biopharm, France.
- Kouadio A.I., Lebrihi A., Agbo G.N., Mathieu F., Pfohl–Leszkowicz, A. et Dosso M.B. (2007).- Influence de l'interaction de la température et de l'activité de l'eau sur la croissance de l'ochratoxine A par *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus ochraceus* sur un milieu de base de café. *Canadian Journal of Microbiology*, **53**, 852–859.
- Kurtzman C.P., Horn, B.W. et Hesseltine, C.W. (1987).- *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaritii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **53**, 147–158.
- Lacey J. (1986).- Factors affecting mycotoxin production. *In: Mycotoxins and phycotoxins* (edited by Steyn, P.S. and Vleggaar, R.), 6th International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins, Pretoria, South Africa.
- Lacey J. (1989).- Prevention of Mold growth and mycotoxin production through control of environmental factors. *In: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. eds. Mycotoxins and phycotoxins* 88. Elsevier, Amsterdam, pp 161–168.
- Larsen K., Jahrl S. et Widenfalk A. (2001).- Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. *Food and Chemical Toxicology*, **39**, 1145–1151.
- Le Bars J. (1988).- Toxicogenesis as a fonction of the ecological conditions of the grain : microorganisms system. In "Presrvation and storage of grain s, seeds and their by products", J.L.MULTON, Lavoisier pub. New–York, Paris, 347–366.
- Lee C.Z., Liou G.Y. et Yuan G.F. (2006).- Comparison of the aflR gene sequences of strains in *Aspergillus* section *Flavi*. *Microbiology*, **152**, 161–170.
- Lee L. S., L. V. Lee Jr., et T. E. Russell. (1986).- Aflatoxin in Arizona cotton seed, field inoculation of bolls by *Aspergillus flavus* spores in winddriven soil. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **63**, 530–532.
- Lerch C.M. et Muller H.M. (1990).- Analysis of ochratoxins from buffered rumen fluid by reversed–phase high performance liquid chromatography. *Chromatographia*. **30**, 424–427

- Lillehoj E. B., W. W. McMillian, W. D. Guthrie, et D. Barry. (1980).- Aflatoxin-producing fungi in preharvest corn, inoculum source in insects and soils. *Journal of Environmental Quality*, **9**, 691–694.
- Lillehoj E.B. et Elling F. (1983).- Environnemental conditions that facilitate ochratoxin contamination of agricultural commodities. *Acta Agriculturae Scandinavica*, **33**, 113–128.
- Llorens A., Hinojo M., Mateo R., Medina A., Valle-Algarra F., González-Jaén, M. et Jiménez M. (2006).- Variability and characterization of mycotoxin-producing *Fusarium* spp isolates by PCR-RFLP analysis of the IGS α -DNA region. *Antonie van Leeuwenhoek*, **89**, 465–478
- Lopez-Garcia R., Park D.L. et Gutierrez de Zubiaurre M.B. (1999).- Procédés pour réduire la présence des mycotoxines dans les denrées alimentaires. In : Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risque, TEC & DOC, 387–408.
- Lund F. et Frisvad J.C. (2003).- *Penicillium verrucosum* in cereals indicates production of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology*, **95**, 1117–1123.
- Maaroufi K., Achour A., Betbeder A.M., Hammami M., Ellouz F., Creppy E.E. et Bacha H. (1995a).- Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin OTA, correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. *Archives of Toxicology*, **9**, 552–558.
- Maaroufi K., Achour A., Hammami M., El May M., Betbeder A.M., Ellouz F., Creppy E.E. et Bacha H., (1995b).- OTA in human blood in relation to nephropathy in Tunisia. *Human and Experimental Toxicology*, **14**, 609–615.
- Magan N. et Aldred D. (2005).- Conditions of formation of Ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food Additives and Contaminants*, **S1**, 10–16.
- Magnoli C., Violante, M., Combina M., Palacio G. et Dalcerro A. (2003).- Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, **37**, 179–184.
- Malmauret L., Parent-Massin D., Hardy J. L. et Verger P. (2002).- Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France. *Food Additives and Contaminants*. **19**(6), 524–532.
- Mann R. et Rehm H.J. (1977).- Degradation of aflatoxin B1 by various microorganisms. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **163**, 39–43.
- Mantle P.G. (2002).- Risk assessment and the importance of ochratoxins. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **50**, 143–146.
- Marquardt R.R., Frohlich A.A., (1992).- A review of recent advances in understanding ochratoxicosis, *Journal of Animal Science*, **70**, 3968–3988
- Mazen M.B., Abdel-Hafez S.I.I. et Shaban G.M. (1984).- Survey of the mycoflora of Egyptian wheat grains and their lemmae and paleae. *Mycopathologia*, **85**, 155–159.

- McKeehen J.D., Busch R.H., Fulcher R.G. (1999).- Evaluation of wheat (*Triticum aestivum* L.) phenolic acids during grain development and their contribution to *Fusarium* resistance. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **47**, 1476–1482.
- Medina A., Mateo R., Lopez–Ocana L., Valle-Algarra F.M., Jimenez M. (2005).- Study of Spanish Grape Mycobiota and ochratoxin A Production by Isolates of *Aspergillus tubingensis* and Other Members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 4696–4702.
- Miller D. M. et Wilson D. M. (1994).- Veterinary diseases related to aflatoxins. In: Eaton, D. L., Groopman, J. D., eds. The Toxicology. Of Aflatoxins. San Diego, CA, Academic Press, pp. 347–364.
- Miller J.D. (1995).- Fungi and mycotoxins in grain : Implications for stored product research. *Journal of Stored Products Research*, **31**, 1–16.
- Miller J.D. (2002).- Aspects of the ecology of *Fusarium* toxins in cereals. *Advances Experimental Medical Biology*, **504**, 19–27.
- Miller J.D. et Trenholm H.L. (1994).- Mycotoxins in grain : compounds other than Aflatoxin. Eagan press, st Paul, Minnesota, USA.
- Miraglia M. et Brera C. (2002).- SCOOP Task 3.2.7 "Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States".
- Mirete S., Vazquez C., Mule G., Jurado M. et Gonzalez-Jaen M.T. (2004).- Differentiation of *Fusarium verticillioides* from banana fruits by IGS and EF–1a sequence analyses. *European Journal of Plant Pathology*, **110**, 515– 523.
- Mitchell D., Parra R., Aldred D. et Magan N. (2004).- Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*, **97**, 439–445.
- Molinié A. et Pfohl–Leszkowicz A. (2002).- Les mycotoxines dans les céréales, les points importants de contrôle de la production au stockage, le devenir des produits dérivés. Les notes ASEDIS–SO, Hors–série spécial Mycotoxines, 32–42.
- Molinié A., Faucet V., Castegnaro M., Pfohl–Leszkowicz A. (2005).- Analysis of some breakfast cereals collected on the French market for their content in OTA, Citrinin and Fumonisin B1. Development of a new method for simultaneous extraction of OTA and Citrinin. *Food Chemistry*, **92**, 391–400.
- Monaci L. et Palmisano F. (2004).- Determination of ochratoxin A in foods, state-of-the-art and analytical challenges Determination of ochratoxin A in foods, state-of-the-art and analytical challenges. [Analytical and Bioanalytical Chemistry](#), **378**, 96–103.

- Montville T.J. et Shih P.L. (1991). -Inhibition of mycotoxigenic fungi in corn by ammonium and sodium bicarbonate. *Journal of Food Protection*, **54**, 295–297.
- Moss M.O. (1996).- Mode of formation of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, **13S**, 5–9.
- Mullis K.B., Faloona F.A., Scharf S.J., Saiki R.K., Horn G.T. et Erlich H.A. (1986).- Specific enzymatic amplification of DNA in vitro, the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **51**, 263–273.
- Murphy P.A., Hendrich S., Landgren C., Bryant CM. (2006).- Food mycotoxins, an update. *Journal of Food Science*, **71**(5), 51–65.
- Nakajima M., Tabata S., Akiyama H., Itoh Y., Tanaka T., Sunagawa H., Tyanan T., Yoshizawa T. et Kumagai S. (2004).- Occurrence of aflatoxin M1 in domestic milk in Japan during the winter season. *Food Additive and Contaminants*, **21**(5), 472–478.
- Northolt M. D. et Bullerman L .B. (1982).- Prevention of mould growth and toxin production through control of environmental conditions. *Journal of Food Protection*, **45**, 519–26.
- Novas M. V. et Cabral D. (2002).- Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus* from peanut in Argentina. *Plant Diseases*, **86**, 215–219.
- O.M.S (Organisation Mondiale pour la Santé) (2002).- Evaluation de certaines mycotoxines dans les aliments. Rapport de la cinquante–sixième réunion du Comité mixte FAO/OMS d’experts des additifs alimentaires, Série de rapports techniques de l’OMS no 906, Organisation mondiale de la santé (OMS), Genève, Suisse.
- Orum T. V., D. M. Bigelow M. R. Nelson D. R. Howell et P. J. Cotty. (1997).- Spatial and temporal patterns of *Aspergillus flavus* strain composition and propagule density in Yuma County, Arizona, soils. *Plant Diseases*, **81**,911–916.
- Osborne B.G., Ibe F., Brown, G.L., Petagine F., Scudamore K.A., Banks J.N., Hetmanski M.T. et Leonard C.T (1996).- The effects of milling and processing on wheat contaminated with ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*,**13**, 141–153.
- Pardo E., Marín S., Sanchis V., Ramos A.J. (2004a).- Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. *International Journal of Food Microbiology*, **95**, 79–88.
- Pardo E., Marín S., Sanchis V. et Ramos A.J. (2005).- Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes. *Food Microbiology*, **22**, 383–389.

- Pardo E., Marín, S., Solsona A., Sanchis V., Ramos A.J. (2004b).- Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* affected by water activity and temperature on a barley-based medium. *Food Microbiology*, **21**, 267–274.
- Park D.I. (1993).- Perspectives on mycotoxin decontamination procedures. *Food Additives and Contaminants*, **10**, 49–60.
- Park D.L., Lee L.S., Price, R.L. et Pohland A.E. (1988). Review of decontamination of aflatoxin by amination, current status and regulation. *Journal- Association of Official Analytical Chemists*, **71**, 685–702.
- Park D.L., Liang B. (1993).- Perspectives of aflatoxin control for human food and animal feed. *Trends Food Science Technology*, **4**(10), 334–42.
- Park J.W., Kim E.K., Shon, D.H. et Kim, Y.B. (2002).- Natural co-occurrence of Aflatoxin B1, Fumonisin B1 and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea. *Food Additives and Contaminants*, **19**, 1073–1080.
- Patino B., Gonzalez-Salgado A., Gonzalez-Jaen, M.T. et Vazquez, C. (2005).- PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. *International Journal of Food Microbiology*, **104**, 207–214.
- Patino B., Mirete S., Gonzalez-Jaen M.T., Mulé G., Rodríguez T. et Vazquez C. (2004).- PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. *Journal of Food Protection*, **67**, 1278–1283.
- Pedersen L., Skouboe P., Boysen M., Souleb J., Rossen L. (1997).- Detection of *Penicillium* species in complex food samples using the polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*, **35**, 169–177.
- Pelant K. (2002).- Characterization of fungi with molecular methods. Thèse de doctorat de l'Université Karl-Franzens Graz, Institut für Botanik. Graz, 102p.
- Peltonen K., El-Nezami H., Salminen S. et Ahokas J. (2000).- Binding of aflatoxin B1 by probiotic bacteria. *Journal of Science Food and Agriculture*, **80**, 1–4.
- Peraica M, Domijan A.M., Fuchs R., Lucic A. et Radic B. (1999).- The occurrence of ochratoxin A in blood in general population of Croatia. *Toxicology Letters*, **110**, 105–112.
- Peterson S.W. (2000).- In: R.A. Samson, J.I. Pitt (Eds.), *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*, Harwood Academic, The Netherlands pp. 163–178.
- Petrova-Bocharova T., Chernozemsky I.N. et Castegnaro M. (1988).- Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food Additives and Contaminants*, **5**, 299–301.

- Petzinger E. et Weindenbach A. (2002).- Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Production Science*, **76**, 245–250.
- Pfohl-Leszkowicz A. (1999).- Ecotoxicogénèse. in : Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risque, Ed. TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 17–35.
- Pfohl-Leszkowicz A. et Castegnaro M. (1999).- L'ochratoxine A. in : Les mycotoxines dans l'alimentation , évaluation et gestion du risque, eds Technique et Documentation, chapitre 9, 249–277.
- Pfohl-Leszkowicz A. et Castegnaro M. (2002).- Rôles des mycotoxines dans le développement de certains cancers. Dans Toxines et recherches biomédicales, collection SFET, Goudey–Perrière, F., Bon Cassian, Puiseux-Dao, S. & Sauviat M–P (eds) Elsevier, pp 143–152.
- Pfohl-Leszkowicz A., Guerre P. et Galtier P. (1999).- Métabolisation des mycotoxines. In: Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risque, Ed TEC & DOC
- Pfohl-Leszkowicz A., Petkova–Bocharova T., Chernozemsky I.N. et Castegnaro M. (2002).- Balkan endemic nephropathy and the associated urinary tract tumours, review on etiological causes, potential role of mycotoxins. *Food Additive and Contaminants*, **19**, 282–302.
- Pietri A., Bertuzzi T., Pallaroni L. et Piva G. (2004).- Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in northern Italy, *Food Additive and Contaminants*, **21**, 479–487.
- Pildain M.B., Vaamonde, G. et Cabral D. (2004).- Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin : mycotoxin and sclerotia production. *International Journal of Food Microbiology*, **93**, 31–40.
- Pitt J.I. (2000).- Toxigenic fungi, which are important? *Medical Mycology*, **38**, 17–22.
- Pitt J.I. Basilico J.C., Abarca M.L. et Lopez C. (2000).- Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, **38**, 41–46.
- Pitt J.I. et Miscamble B.F. (1995).- Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *Journal of Food Protection*, **58**, 86–90.
- Pitt J.I., Hocking A.D., Miscamble B.F., Dharmaputra O.S., Kuswanto K.R., Rahayu E.S. et Sardjono A.N. (1998).- The mycoflora of food commodities from Indonesia. *Journal of Food Microbiology*, **1**, 41–60.
- Pitt J.I., Hocking, A.D. (1997).- Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic and Professional, London.
- Pittet A. (2001).- Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds, a decade in review. In: De Koe WJ, Samson RA, van Egmond HP, Gilbert J, Sabino M, editors. Mycotoxins and phycotoxins at the turn of the millennium; Guarujá (Brazil). p 153–172.

- Punja Z.K. et Grogan R.C. (1982).- Effects of inorganic salts, carbonate bicarbonate anions, ammonia, and the modifying influence of pH on sclerotial germination of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, **72**, 635–639.
- Purchase I.F.H. (1971).- The acute toxicity of the mycotoxin cyclopiazonic acid to rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **18**, 114–123.
- Ramos A.J., Labernia N., Marin S., Sanchis V. et Magan N. (1998).- Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grain s. *International Journal of Food Microbiology*, **44**, 133–40.
- Raper K. et Fennell D.J. (1965).- The genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins editors, Baltimore.
- Reiss E., Tanaka K., Bruker G., Chazalet V., Coleman D., Debeauvais J.P., Hanazawa R., Latgé J.P., Lortholary J., Makimura K., Morrison C.J., Murayama S.Y., Naoe S., Paris S., Sarfati J., Shibuya K., Sullivan D., Uchida K. et Yamaguchi H. (1998).- *Molecular Diagnosis and Epidemiology of Fungal Infections*, **36**, 249–257.
- Resnik S., Costarrica M.L. et Pacin A. (1991).- Mycotoxins in Latin America and the Caribbean. *Food Control*, **6**, 19–28.
- Richard J.L., Bhatnagar D., Peterson S. et Sandor G. (1992). Assessment of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* isolates from Hungary. *Mycopathologia*, **120**, 183–188.
- Richard J.L., Plattner R.D., Mary J. et Liska S.L. (1999).- The occurrence of ochratoxin A in dust collected from a problem household. *Mycopathologia*, **146**, 99–103.
- Rigó K. Varga J., Toth B., Téren J., Mesterhazy A. et Kozakiewicz Z. (2002).- Evolutionary relationships within *Aspergillus* section *Flavi* based on sequences on the intergeneric transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. *Journal of General Applied Microbiology*, **48**, 9–16.
- Rizzo A., Eskola M. et Atroshi F. (2002).- Ochratoxin A in cereals, foodstuffs and human plasma. *European Journal of Plant Pathology*, **108**, 631–637.
- Rojas T.R., Sampayo C.A.F., Vazquez B.I., Franco C.M. et Cepeda A. (2005).- Study of interferences by several metabolites from *Aspergillus* spp. in the detection of aflatoxigenic strains in media added with cyclodextrine. *Food Control*, **16**, 445–450.
- Romero S.M. Patriarca A., Fernández Pinto V., Vaamonde G. (2007).- Effect of water activity and temperature on growth of ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Argentinean dried vine fruits. *International Journal of Food Microbiology*, **115**, 140–143.

- Romero S.M., Comerio R.M., Larumbe G., Ritieni A., Vaamonde G. et Fernandez Pinto V. (2005).- Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, **104**, 43– 49.
- Rosner H. (1998). Mycotoxin regulations, an update. *Revue de médecine vétérinaire*, **149**, 679–680.
- Russell R. et Paterson, M. (2006).- Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process Biochemistry*, **41**, 1467–1474.
- Saiki R., Scharf S., Faloona F., Mullis K., Horn C., Erlich H. et Arnheim N. (1985).- Enzymatic amplification of β - globin genomic sequences and restriction site analyses of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350–1354.
- Saito M. et Tsuruta O. (1993).- A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. Proc of the Japanese Association of Mycotoxicology Mycotoxicology, 37, 31–36.
- Saitou N. et Nei M. (1987).- The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**:406–425.
- Sakai M., Miyauchi K., Kato, N., Masai E., Fukuda M. (2003).- 2-Hydroxypenta-2,4-dienoate metabolic pathway genes in a strong polychlorinated biphenyl degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 327–433.
- Samapundo S., De Meulenaer B., Osei-Nimoh D., Lamboni Y., Debevere J. et Devlieghere F. (2007).- Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage? *Food Microbiology*, **24**, 465–473
- Samson R.A. et Pitt JI (eds) (2000).- Integration of Modern Methods for *Penicillium* and *Aspergillus*, 510 pp. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, the Netherlands.
- Samson R.A., Hong S.B. et Frisvad J.C. (2006).- Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, **44**, 133–148.
- Samson R.A., Houbraken J.A., Kuijpers A.F.A., Frank M.J. et Frisvad J.C. (2004).- New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, **50**, 45–61.
- Sargeant K., Sheridan A., O’Kelly J. et Carnaghan R.B.A. (1961).- Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature*, **192**, 1096–1097.
- Scheidegger K.A. et Payne G.A. (2003).- Unlocking the secrets behind secondary metabolism, A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology and Toxin Review*, **22**, 427–463.
- Schiefer H.B. (1986).- Health effects from mycotoxins (volatile or absorbed to particulates), a review of the relevant data in animal experiments. In: Significance of fungi in indoor air,

- Report of a working group. Health et Welfare Canada Working Group on Fungi and Indoor Air. 18 pp. (in Scott J.A. 2001. Studies On Indoor Fungi).
- Schollenberger M., Jara H.T., Suchy S., Drochner W. et Muller H.M. (2002).- *Fusarium* toxins in wheat flour collected in an area in south west Germany. *International Journal of Food Microbiology*, **72**, 85–9.
- Scott PM. (1996).- Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A, introduction. *Food Additives and Contaminants*, **13** S, 19–21
- Scudamore K. A. (1999).- Mycotoxins, and independent assessment of MAFF-funded applied research and surveillance 1993–1996. Report of studies commissioned by the Food Contaminants Division of the UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, PB 4045.
- Scudamore K.A. (2005).- Prevention of Ochratoxin A in commodities and likely effects of processing fractionation and animal feeds. *Food Additives and Contaminants*, **1S**, 17–25.
- Serra R., Abrunhosa L., Kozakiewicz Z. et Venâncio A. (2003).- Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, **88**, 63– 68.
- Shepard G.S., Leggott N.L., Stockenstöm S., Somdyala N.IM. et Marasas W.F.O. (2002).- Preparation of South African maize porridge, effect on fumonisin mycotoxin levels. *South African Journal of Science*, **98**, 393–396.
- Shih C.N. et Marth E.H. (1975).- Aflatoxin can be degraded by the mycelium of *Aspergillus parasiticus*. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **158**, 361–362.
- Skaug M.A., Eduard W. et Stormer F.C. (2001).- Ochratoxin A in airborne dust and fungal conidia. *Mycopathologia*, **151**, 93–98.
- Smith J.E. et Moss M.O. (1985).- Mycotoxins. Formation, analysis and significance, John Wiley et Son, Chichester.
- Solfrizzo M., Girolamo A. et Visconti A. (2001).- Determination of Fumonisin B1 and B2 in cornflakes by high performance liquid chromatography and immune affinity clean-up. *Food Additives and Contaminants*, **18**, 227–235.
- Steyn P., (1984).- Ochratoxins and related dihydrocoumarins in , Betina ed. Mycotoxins–production, isolation, separation and purification. Elsevier. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, 183–216.
- Suàrez-Quiroz M., Gonzàlez-Rios O., Barel M., guyot B., Schorr-galindo S., et Guiraud, J.P. (2004).- Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. *Food Microbiology*, **21**, 629–634.

- Summerbell R.C. (1998). Taxonomy and ecology of *Aspergillus* species associated with colonizing infections of the respiratory tract. *Immunology and allergy clinics of North America*, **18**, 549–573.
- Surget A. et Barron C. (2005).- Histologie du grain de blé. *Revue Industrie des céréales*. **145**, 4–7.
- Tabuc C. (2007).- Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de Doctorat, 190p. INP Toulouse, France.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. et Kumar S. (2007).- MEGA4, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596–1599.
- Taniwaki M.H., Hocking A.D., Pitt J.I. et Fleet G.H. (2001).- Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, **68**, 125–133.
- Taniwaki M.H., Pitt, J.I., Teixeira A.A. et Iamanaka B.T. (2003).- The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*, **82**, 173–179.
- Teniola O.D., Addo P.A., Brost I.M., Färber P., Jany K.–D., Alberts J.F., Van Zyl W.H., Steyn P.S. et Holzapfel W.H. (2005).- Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov. *International Journal of Food Microbiology*, **105**, 111–117.
- Téren J., Varga J., Hamari Z., Rinyu E. et Kevei F. (1996).- Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, **134**, 171–176.
- Thuvander A., Paulsen J.E., Axberg K., Johansson N., Vidnes A., Enghardt-Barbieri H., Trygg K., Lund-Larsen K., Jahrl S., Widenfalk A., Bosnes V., Alexander J., Hult, K. et Olsen M. (2001).- Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. *Food and Chemical Toxicology*, **39**, 1145–1151.
- Toncheva D, Dimitrov T. et Tzoneva M. (1998).- Cytogenetic studies in Balkan endemic nephropathy. *Nephron*, **48**(1), 18–21.
- Tran-Dinh N., Pitt J. I. et Carter D.A. (1999).- Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycological Research*, **103**, 1485–1490.
- Turner W.B. Aldridge D.C.(1983).-, “Fungal metabolites II”, Acad. Press, N.Y. and London, 631p.
- Uchiyama M, Isohata E, Takeda Y. (1976).- A case report on the detection of ochratoxin A from rice. *Journal of Food and Hygienics Society of Japan*, **17**, 103.

- Ueno Y., Kawamura O., Sugiura Y., Horiguchi K., Nakajima M., Yamamoto K. et Sato S. (1991).-Use of monoclonal antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin-producing fungi. *In: Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I. N. and Bartsch, H., (eds), Mycotoxins, Endemic Nephropathy and urinary tract tumours, (pp 71–75). IARC–Science–Publ., Lyon, France.*
- Vaamonde G., Patriarca A., Fernandez Pinto V., Comerio, R. et Degrossi C. (2003).- Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, **88**, 79–84.
- Van der Merwe K.J., Steyn P.S., Fourie L., de Scott B. et Theron J.J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* wilh. *Nature*, **205**, 1112– 1113.
- Van der Stegen G.H.D., Essens P.J.M. et Van der Lijn, J. (2001). Effect of roasting conditions on reduction of OTA in coffee. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, **49**, 4713–4715.
- Van Egmond H.P. (1999).- Worldwide Regulations for Mycotoxins. Document de travail. Troisième Conférence internationale mixte FAO/OMS/PNUC sur les mycotoxines. MYC–CONF/99/8a. Tunis (Tunisie), 3–6 March 1999.
- Varga J., Juhász A., Kevei F. et Kozakiewicz Z. (2004).- Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. *European Journal of Plant Pathology*, **110**, 627– 640.
- Varga J., Kevei E., Rimyu E., Teren J. et Kazakiewicz Z. (1996).- Ochratoxin production by *Aspergillus* species, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 4461–4464.
- Varga J., Kevei F., Vriesema A., Debets F., Kozakiewicz Z. et Croft J.H. (1994).- Mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in field isolates of the *Aspergillus niger* aggregate. *Canadian Journal of Microbiology*, **40**, 612–621.
- Varga J., Rigo K., Toth B., Teren J. et Kozakiewicz Z. (2003). Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology*, **41**, 29–36.
- Vargas E.A., Preis R.A., Castro L. et Silva C.M., (2001).- Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, G2, zearalenone and fumonisin B1 in Brazilian corn. *Food Additive and Contaminants*, **18**, 981–986.
- Verger Ph., Volatier J. L. et Dufour A. (1999).- Estimation des niveaux théoriques d'ingestion d'aflatoxines et d'ochratoxine. Dans, Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risque. TEC&DOC, Lavoisier.
- Wafa E.W., Yahya R.S., Sobh M.A., Eraky I., El-Baz M, El-Gayar H.A.M., Betbeder A.M. et Creppy EE. (1998).- Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt, A preliminary study. *Human and Experimental Toxicology*, **17**, 124–129.

- Wallace H.A.H. et Sinha R.N. (1962).- Fungi associated with hot spots in farm stored grain . *Canadian Journal of Plant Science*, **42**, 130–141.
- Watson S.A., Mirocha C.J., and Hayes A.W. (1984). Analysis for Trichothecenes in Samples from Southeast Asia Associated with Yellow Rain. *Fundamental Applied Toxicology*, **4**, 1984, pp. 700-717.
- Weidenbörner M. (1998).- Lebensmittel-Mykologie B.Behr's Verlag GmbH und Co.1 ISBN 3-86022-457-3.
- Weidenbörner M. (2001).- Pumpkin seeds, the mycobiota and potential mycotoxins. *European Food Research and Technology*, **212**, 279–281.
- Weidenbörner M., Wiczorek C., Appel S., Kunz, B. (2000).-Whole wheat and white wheat flour " the mycobiota and potential mycotoxins. *Food Microbiology*, **17**, 103-107.
- White T., Burns T. Lee S. et Taylor J. (1990).- Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky et T.J. White, Editors, PCR protocols. A guide to methods and applications, Academic Press, Inc, Sandiego, California. pp. 315–322.
- Wicklow D.T., et Shotwell O.L. (1983)- Intrafungal distribution of aflatoxin among conidia and selerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Canadian Journal of Microbiology*, **29**, 1–5.
- Wilson D.M., Mubatanhema W. et Jurjevic Z. (2002).- Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns, *Advances Experimental and Medical Biology*, **504**, 3–17.
- Wogan G. N. (2000).- Impacts of chemicals on liver cancer risk. *Seminars in Cancer Biology*, **10**(3), 201–210.
- Xiao H., Madhyastha S., Marquardt R.R., Li, S., Vodela J.K., Frohlich A.A. et Kemppainen B.W. (1996b).- Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone forms and several of its analogs, structure–activity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **137**, 182–192.
- Xiao H., Marquardt R.R., Abramson D., Frohlich A. (1996a). Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of *Aspergillus ochraceus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 648–655.
- Yabe K. et Nakajima H. (2004).- Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **64**,745–755.
- Yiannikouris A. et Jouany J.P. (2002).- Mycotoxins in feeds and their fate in animals, a review. *Animal Research*, **51**, 81–99.

- Zhang J. et Madden T.L. (1997).- Power BLAST, A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Research*, **7**, 649–656.
- Zhao J., Kong F., Li R., Wang X., Wan Z. et Wang D. (2001).- Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**, 2261– 2266.
- Zinedine A., Brera, C., Elakhdari S., Catano C., Debegnach F., Angelini S., De Santis B., Faid M., Benlemlih M., Minardi V. et Miraglia M. (2006).- Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control*, **17**, 868–887.
- Zinedine A., González–Osnaya L., Soriano J.M., Moltó J.C., Idrissi L. et Mañes J. (2007a).- Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco, *Int J Food Microbiology*, **114** (1), 25–29.
- Zinedine A., Soriano J.M., Juan C., Mojemmi B., Moltó J.C., Bouklouze A., Cherrah Y., Idrissi L., El Aouad R. et Mañes J. (2007b).- Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Salé area, Morocco. *Food Additives and Contaminants*, **24** (3), 285–291.

Sites web.

www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds/IDPlateI.html.

www.univ-brest.fr/.../Myco/fiches/aspeochra.html.

www.thegourdreserve.com/mold/into.shtml.

www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds/IDPlateI.html,

ANNEXE I

Compositions des milieux de cultures utilisés

Milieu CYA (Czapek Yeast extract Agar)

Saccharose	30 g
Extrait de levure	5 g
Czapek concentré	10 ml
K ₂ HPO ₄	1 g
Agar15 g
Eau distillée1000 ml
pH final=	6,2 ± 0,2

Czapek concentré

NaNO ₃30 g
KCl5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O5 g
Fe SO ₄ , 7H ₂ O0,1 g
Zn SO ₄ , 7H ₂ O	0,1 g
Cu SO ₄ , 5 H ₂ O0,05 g
Eau distillée	100 ml

Milieu Czapek agar

Sucrose	30 g
NaNO ₃	3 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Agar	15 g
Distilled water	1000 ml
pH final=	6,2 ± 0,2

Extract de Malt Agar (MEA)

Extrait de Malt.....	20 g
Glucose.....	20 g
Peptone.....	20g
Eau distillée	1000 ml
pH final	5,6 ± 0,2

Milieu PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar) :

Pomme de terre	200 g
Agar	15 g
Glucose	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH final	5,6 ± 0,2

Milieu d'isolement DRBC (Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol Agar)

Glucose.....	10 g
Peptone	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,5 g
Rose Bengale.....	25 mg
Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline)...	2 mg
Chloramphénicol.....	100 mg
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH final 5,6 ± 0,2

- Le rose Bengal est additionné sous forme solubilisée à raison de 0,5 ml/litre de milieu d'une solution de 5% dans l'eau.
- Le dichloran est additionné sous forme solubilisée à raison de 1ml/litre de milieu d'une solution de 0,2% dans l'éthanol.

Milieu à base d'extrait de noix de coco gélosé (Coconut Agar Medium)

Cent grammes (100 g) de la noix de coco déchiquetée sont homogénéisés pendant 5 minutes avec 300 ml d'eau distillée portée à ébullition. Le mélange est filtrée à l'aide du tissu en mousseline. Le pH final est ajusté à 7 avec une solution de NaOH 2N. Le filtrat est additionné de 20 g d'agar puis complété à 1000 ml par l'eau distillée. 3g de β -cyclodextrine (β -cyd) sont ajoutés à un litre de milieu.

N.B. Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage durant 15 min à 120°C.

ANNEXE II

1. Produits chimiques et standards analytiques

Les solvants: acétonitrile (C₂H₃N), chloroforme (CHCl₃), acide chlorhydrique (HCl) à 37%, le méthanol (CH₃OH), éthanol (C₂H₅OH), propanol-2 (C₃H₇OH), acide orthophosphorique à 85% (H₃PO₄) et acide acétique glacial (CH₃COOH) utilisés pour l'extraction et la détection des mycotoxines, ainsi que pour l'extraction des acides nucléiques, sont des solvants de qualité ultrapure, compatibles avec une analyse HPLC. Ils sont fournis par ICS (France) sous la marque (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). L'eau utilisée en HPLC comme phase mobile et en biologie moléculaire ou pour la préparation des solutions est de qualité ultrapure, préparée avec le système de purification MilliQ (Millipore SA, Molsheim, France). Les membranes en nylon de 0,45 µm utilisées pour le dégazage des phases mobiles et les filtres 0,2 µm Spartan RC 13 mm utilisés pour la filtration des échantillons avant leur passage en HPLC, sont fournis par Schleicher et Schüell, France.

L'aflatoxine B1 produite par *A. flavus*, l'ochratoxine A et l'acide cyclopiazonique utilisés comme étalons standards sont fournies par Sigma-Aldrich, France.

2. Appareillage

- Spectrophotomètre UV- visible (Philips PU 8600).
- Agitateur orbital Heidolph unimax 2010.
- Bain à ultra-sons (NEY).
- pH-mètre (Corning- EEL modèle 109).
- Rotavapeur (Certomat RB Braun, Unimax 2010, Heidolph, Germany)
- Bain-marie (Bioblock Scientific, Polystat I ref. 33194 220 V).
- Mixeur (Type 418, Braun, Spain).
- Centrifugeuse à évaporation sous vide "Speedvac concentrator".
- Microcentrifugeuse (112, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).
- Balance de précision (OSI, M-220 D, Drnver Instrument).
- Balance de pesée: Sartorius B 610 S, (Mettler, type B6C 200).
- Etuves (Héraeus).
- Microscope optique (Leica, Leitz DM RB).
- Cuve d'électrophorèse, système horizontal (Embi Tec, San Diego, CA).
- Système sous vide Visiprep de Supelco (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)
- Thermocycleur (Robocycler gradient 96 stratagene).
- Table UV (transilluminator).
- lampe UV (254 nm; 365 nm).
- Filtre en polytrifluoroéthylène (PTFE 0.45µm).
- plaques de gel de silice-60 254F (Merck).
- Seringues (Sun International Trading Wilmington Etats- Unis).

3. Produits et kits pour l'identification moléculaire

- Tris (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).
- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (Euromedex, Paris, France).
- EDTA (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).
- 2- propanol.
- Phénol-chloroforme-alcool isoamylique: 25/24/1 (v/v/v) (MP Biomedicals & Qbiogene, Illkirch, France).
- Bromure d'Ethidium (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).
- Tris-Acétate, EDTA 50X (MP Biomedicals & Qbiogene, Illkirch, France).
- Enzyme de restriction : Bgl II (MP Biomedicals & Qbiogene, Illkirch, France).
- Kit JETQUICK PCR Spin (MP Biomedicals & Qbiogene, Illkirch, France).
- Désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) des quatre bases nucléotidiques (dATP, dGTP, dCTP, dTTP/ 10 mM de chaque).
- Enzyme, la *Taq* DNA polymérase.
- $MgCl_2$.
- Tampon (500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris-HCl pH9).
- Tampon de charge « Blue/Orange Ladin Dey, 6X » (Promega): (30% glycérine, 0,25% de bleu de bromophénol, 0.25 % xylène cyanol dans l'eau).
- L'ADN des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi*

4. Résultat de l'alignement des séquences de la région ITS1-5.8S-ITS4 de l'ADNr des 8 isolats aflatoxinogènes

(AFB3, AF9, AF48, AF92, AF14, AF94 et AF56).

AF9 CTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCATTTCGTGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCCGCCGGAGACACCACGAAC
AF14 CTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCATTTCGTGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCCGCCGGAGACACCACGAAC
AF48 CTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCATTTCGTGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCCGCCGGAGACACCACGAAC
AF56 -----CCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCATTTCGTGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCCGCCGGAGACACCACGAAC
AF92 CTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCATTTCGTGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCCGCCGGAGACACCACGAAC
AF94 CTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCATTTCGTGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCCGCCGGAGACACCACGAAC
AF174 CTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCATTTCGTGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCCGCCGGAGACACCACGAAC
AFB3 CTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCATTTCGTGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCCGCCGGAGACACCACGAAC

AF9 TCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
AF14 TCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
AF48 TCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
AF56 TCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
AF92 TCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
AF94 TCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
AF174 TCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
AFB3 TCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG

AF9 ATAAGTGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC
AF14 ATAAGTGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC
AF48 ATAAGTGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC

AF56 ATAAC TAGTGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC
AF92 ATAAC TAGTGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC
AF94 ATAAC TAGTGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC
AF174 ATAAC TAGTGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC
AFB3 ATAAC TAGTGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC

AF9 CATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTTCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTG
AF14 CATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTTCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTG
AF48 CATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTTCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTG
AF56 CATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTTCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTG
AF92 CATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTTCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTG
AF94 CATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTTCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTG
AF174 CATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTTCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTG
AFB3 CATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTTCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTG

AF9 TCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
AF14 TCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA-----
AF48 TCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
AF56 TCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
AF92 TCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAT---
AF94 TCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATC-TTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
AF174 TCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
AFB3 TCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA

ANNEXE III

Chaines chromatographiques

Le dosage des aflatoxines et d'ochratoxine A a été réalisé sur deux chaînes d'HPLC différentes

- Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (BIO-TEK, Milan, Italie) avec colonne C18, un détecteur U.V à barrettes de diodes (diode array detector 545V) et un logiciel d'exploitation (Kroma 3000).

- Chromatographie liquide à haute performance (Shimadzu, Kyoto, Japon) avec un détecteur de fluorescence (Spectra Physic 2000).

Le dosage des aflatoxines et d'ochratoxine A a été réalisé sur deux chaînes d'HPLC différentes. Pour l'analyse de l'OTA, la chaîne chromatographique utilisée (BIO-TEK, Milan, Italie) est composée d'un système de pompage (Solvent delivery system 525), d'une chambre thermostatée pour la colonne (column thermostat 582), d'un injecteur automatique (autosampler 465) et d'un détecteur U.V à barrettes de diodes (diode array detector 545V) permettant d'établir un spectre U.V (200 à 600 nm). Les différents éléments sont reliés à un micro-ordinateur de type P.C. sur lequel est installé le logiciel Kroma 3000 (Biotek, Milan, Italie). Ce système d'acquisition de données fonctionnant sous environnement Windows NT permet de piloter automatiquement les différents composants du système chromatographique. Il présente aussi toutes les fonctions d'un intégrateur classique de chromatographie. Pour la phase stationnaire, une colonne C18 SB (Zorbax 5 µm, 150 × 4.6 mm) (Agilent Technologies) a été utilisée. En amont de la colonne est placée une précolonne (10 x 4 mm) ayant la même phase stationnaire.

Les aflatoxines sont analysées sur un chromatographe de marque Shimadzu LC-10 (Kyoto, Japon) équipé d'une vanne d'injection (rhéodyne), d'une boucle d'injecteur de 20 µl, et d'un détecteur de fluorescence (Spectra Physic 2000) avec un filtre d'excitation à 362 nm et des filtres d'émission à 425 nm pour B1 et B2 et à 455 nm pour G1 et G2. La colonne analytique utilisée est une colonne C18 (ProntoSil 3µm 250 x 4 mm) reliée à une précolonne (ULTRASEP 10x4 mm). La colonne et la précolonne sont fabriquées par Bischoff, et fournies par ICS, France. La cellule électrochimique, KOBRA Cell®, avec curseur d'intensité du courant placé sur 100 µA, est connecté au système HPLC entre la colonne HPLC et le détecteur de fluorescence (figure ci-après). Les chromatogrammes sont traités par le logiciel Class-LC software 1.6 Shimadzu. Le système d'acquisition des données est le logiciel NORMASOFT commercialisé par ICS, France.

Le KOBRA Cell® offre une méthode de dérivation alternative qui présente l'avantage d'être très simple à mettre en œuvre et d'offrir les mêmes performances que la dérivation à l'iode. Le KOBRA Cell® est une cellule électrochimique qui génère en ligne l'agent de dérivation à partir de bromure de potassium présent dans la phase mobile. La réaction dure 4 secondes à température ambiante et ne nécessite pas de préparation journalière de réactif. Aucun équipement supplémentaire n'est requis et la cellule demande très peu d'entretien.

Le principe de cette technique est de délivrer au KOBRA Cell® la phase mobile provenant de la colonne HPLC, contenant les aflatoxines et l'agent précurseur de dérivation: le bromure de potassium. Le branchement du KOBRA Cell® sur le courant va permettre d'appliquer un potentiel constant au niveau de l'électrode de travail, et ainsi de générer électro chimiquement du brome qui va se fixer sur les aflatoxines B1 et G1.

Les dérivés bromés des aflatoxines B1 et G1 vont présenter une fluorescence supérieure à celle existant naturellement.